

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ ⑫ Offenlegungsschrift
⑯ ⑯ DE 102 00 865 A 1

⑯ Int. Cl.⁷:

G 01 N 33/543

G 01 N 21/64

G 01 N 33/52

⑯ Aktenzeichen: 102 00 865.5
⑯ Anmeldetag: 11. 1. 2002
⑯ Offenlegungstag: 10. 10. 2002

⑯ Innere Priorität:

101 15 752. 5 28. 03. 2001

⑯ Anmelder:

Clondiag Chip Technologies GmbH, 07743 Jena, DE

⑯ Vertreter:

Maiwald Patentanwalts GmbH, 80335 München

⑯ Erfinder:

Ermantraut, Eugen, 07745 Jena, DE; Kaiser, Thomas, 07743 Jena, DE; Tuchscheerer, Jens, 07743 Jena, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑯ Vorrichtung zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen

⑯ Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen und/oder zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen, wobei die Vorrichtung einen im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Träger umfasst, auf dem in mehreren definierten Bereichen Polymerschichten mit zum Teil unterschiedlicher Dicke und/oder Zusammensetzung aufgebracht sind. Diese Polymerschichten sind derartig auf den Träger aufgebracht, dass sie nach entsprechender Bestrahlung fluoreszieren und die Vorrichtung damit als Fluoreszenzzeichstandard verwendet werden kann. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung von solchen Fluoreszenzzeichstandards.

DE 102 00 865 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung, die den Vergleich der Abbildungseigenschaften und Signalempfindlichkeit von Fluoreszenzdetektionssystemen und die 10 spezifische Referenzierung von Fluoreszenzsignalen ermöglicht, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.

[0002] Biomedizinische Tests basieren häufig auf dem Nachweis einer Wechselwirkung zwischen einem Molekül bzw. einer Affinitätsmatrix, dessen Identität bzw. deren Beschaffenheit bekannt ist (Sonde), und einem nachzuweisenden, unbekannten Molekül bzw. nachzuweisenden, unbekannten Molekülen (Ziel- bzw. Targetmolekül oder Target). [0003] Bei modernen Tests sind die Sonden, so es sich bei ihnen um Moleküle handelt, häufig in Form einer Substanzbibliothek in bekannter Menge und Position auf Trägern immobilisiert. Solche Vorrichtungen werden auch Sonden-Arrays oder Chips genannt. Ein Sonden-Array umfasst charakteristischerweise mehrere so genannte Array-Elemente, bei denen es sich um die Bereiche eines Sonden-Arrays handelt, in denen eine bestimmte Molekularsonde häufig in mehrfacher Kopie immobilisiert ist. Die Summe aller belegten Array-Elemente bildet damit das Sonden-Array.

[0004] Die Immobilisierung von molekularen Sonden in Form einer Substanzbibliothek auf Sonden-Arrays ermöglicht es, eine Probe, die die nachzuweisenden Target-Moleküle enthält, parallel an mehreren Sonden gleichzeitig zu analysieren, was eine systematische Analyse mit hohem Durchsatz bei geringem Zeitaufwand ermöglicht. (high throughput screening, D. J. Lockhart, E. A. Winzeler, Genomics, Gene Expression and DNA Arrays, Nature 2000, 405, 827-836). Für die Herstellung der Sonden-Arrays werden die Sonden üblicherweise in vorgegebener Art und Weise auf einer geeigneten, beispielsweise in WO 00/12575 beschriebenen Matrix immobilisiert (siehe z. B. US 5,412,087, WO 98/36827) bzw. synthetisch erzeugt (siehe z. B. US 5,143,854).

[0005] Der Nachweis einer Wechselwirkung zwischen der Sonde und dem Targetmolekül erfolgt prinzipiell folgendermaßen:

Die Sonde bzw. die Sonden werden in vorgegebener Art und Weise an einer bestimmten Matrix in Form eines Sonden-Arrays fixiert. Die Targets werden dann in einer Lösung mit den Sonden in Kontakt gebracht und unter definierten Bedingungen inkubiert. Weisen die Sonde und das Targetmolekül aufgrund von komplementären Eigenschaften eine Affinität zueinander auf, so findet während der Inkubation zwischen der Sonde und dem Target eine spezifische Wechselwirkung statt. Die dabei auftretende Bindung ist deutlich stabiler als die Bindung von Targetmolekülen an Sonden, die für das Targetmolekül nicht spezifisch sind.

[0006] Zum Entfernen von unspezifisch gebundenen Targetmolekülen wird das System mit entsprechenden Lösungen gewaschen oder erwärmt bzw. entsprechend restriktiv wirkenden Maßnahmen unterworfen.

[0007] Der Nachweis der spezifischen Wechselwirkung zwischen einem Target und seiner Sonde kann dann durch eine Vielzahl von Verfahren erfolgen, die in der Regel von der Art des Markers abhängen, der je nach Aufbau des Experiments vor, während oder nach der Wechselwirkung des Targetmoleküls mit dem Sonden-Array in die Targetmoleküle oder in die Sondenmoleküle eingebracht worden ist. Bei solchen Markern kann es sich z. B. um fluoreszierende Gruppen, um radioaktive Markierungen, um Enzyme oder chemolumineszierende Moleküle handeln, wobei die zu verwendende Nachweismethode sich nach der Art des Markers richtet (A. Marshall, J. Hodgson, DNA Chips: An Array of Possibilities, Nature Biotechnology 1998, 16, 27-31; G.

Ramsay, DNA Chips: State of the Art, Nature Biotechnology 1998, 16, 40-44).

[0008] Abhängig von der auf dem Sonden-Array immobilisierten Substanzbibliothek und der chemischen Natur der Targetmoleküle können anhand dieses Testprinzips Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuren und Nukleinsäuren, zwischen Proteinen und Proteinen sowie zwischen Nukleinsäuren und Proteinen untersucht werden (zur Übersicht siehe F. Louispeich, H. Zorbas, 1998, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin).

[0009] Als Substanzbibliotheken, die auf Sonden-Arrays oder Chips immobilisiert werden können, kommen dabei Antikörper-Bibliotheken, Rezeptor-Bibliotheken, Peptid-Bibliotheken und Nukleinsäure-Bibliotheken in Frage. Die Nukleinsäure-Bibliotheken nehmen die mit Abstand wichtigste Rolle ein, wobei es sich besonders häufig um DNA-Molekül- oder RNA-Molekül-Bibliotheken handelt. Die Sonden-Array basicric Analyse von Nukleinsäure-Nukleinsäure-Wechselwirkungen folgt dabei den Prinzipien der Nukleinsäure-Hybridisierungstechnik (A. A. Leitch, T. Schwarzacher, D. Jackson, I. J. Leitch, 1994, In vitro-Hybridisierung, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin/Oxford).

[0010] Üblicherweise erfolgt der Nachweis spezifischer Wechselwirkungen zwischen einer Sonde und einem Target durch fluoreszenzoptische Auswertung, da diese sich durch eine hohe Empfindlichkeit, durch Vielseitigkeit hinsichtlich der verwendbaren Marker und durch die Möglichkeit zur orts- und zeitaufgelösten Detektion der Wechselwirkung mit vergleichsweise geringem Aufwand (vor allem im Vergleich zu massenspektroskopischen Verfahren) sowie durch die Eliminierung der Strahlenbelastung, wie sie bei der Verwendung von radioaktiven Markierungsreagenzien auftritt, auszeichnen. Zusätzlich kann abhängig von den zur Markierung verwendeten Fluorophoren der Anregungs- und Detektionswellenlängenbereich eingestellt werden.

[0011] Allerdings werden qualitative und quantitative fluoreszenzoptische Auswertungen in der Praxis durch eine Reihe von Faktoren negativ beeinflusst, die in der Fluoreszenzspektroskopie an sich, in der Art der gewählten Fluoreszenzmarker und in der Art und dem Aufbau der verwendeten Detektionssysteme begründet sind. Zu diesen Faktoren zählen vor allem unspezifische Hintergrundsignale (Signalrauschen), die durch intrinsische optische Eigenschaften der

Fluoreszenzmarker (z. B. Bleichen, Quenching bzw. Fluoreszenzlösung der verwendeten Farbstoffe), durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Sonde bzw. Targets und deren Lösungen (z. B. Autofluoreszenz), durch Schwankungen im optischen System (z. B. Strahlungsintensität der Lichtquelle und Fremdlicht) und durch Aufbau und Art der verwendeten Detektionssysteme (z. B. Autofluoreszenz der Assemblierungselemente, Fähigkeit der Detektoren zur räumlichen und zeitlichen Auflösung, Streuungen, Reflexionen) zustande kommen.

[0012] Zur Beurteilung, ob eine gemessene Fluoreszenzintensität ein Signal darstellt oder lediglich zum Signalrauschen gehört, müssen daher die Störeinflüsse beseitigt bzw. minimiert werden und Vorrichtungen und Methoden eingesetzt werden, die eine Referenzierung der gemessenen Fluoreszenzsignale erlauben. Solche Vorrichtungen werden auch als Fluoreszenzstandard bezeichnet.

[0013] Aus dem Benützen, das gerätebedingte Signalrauschen zu minimieren, resultiert der hohe technische Aufwand zum Aufbau hochsensitiver Detektoren, die eine qualitative und quantitative Auswertung von Fluoreszenzsignalen erlauben. Insbesondere für die Auswertung beim high throughput screening von Sonden-Arrays, das eines gewissen Automatisierungsgrads bedarf, sind speziell angepasste

Detektionssysteme erforderlich.

[0014] Beim fluoreszenzoptischen Auslesen von molekularen Sonden-Arrays mittels Standardfluoreszenzaufbauten werden z. B. CCD (Charge Coupled Device) basierte Detektoren verwendet, die zur qualitativen Unterscheidung von optischen Effekten (Streuung, Reflexion) die Anregung der Fluorophore im Dunkelfeld (durch Auflicht oder Durchlichtmikroskopie) realisieren (C. E. Hooper et al., Quantitative Photone Imaging in the Life Sciences using intensified CCD Cameras, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 1990, 337-344). Die Abbildung der Sonden-Arrays erfolgt dabei entweder in einer Belichtung oder durch Rastern unter Verwendung hochauflösender Optiken. Um auftretende Autofluoreszenz oder systembedingte optische Effekte wie die Beleuchtungshomogenität über den gesamten Sonden-Array zu minimieren bzw. zu gewährleisten, sind komplizierte Beleuchtungsoptiken und Filtersysteme notwendig.

[0015] Konfokale Scanning-Systeme (beschrieben in US 5.304.810) erlauben die Auswertung von Fluoreszenzsignalen aus ausgewählten Ebenen einer Probe. Sie beruhen auf der Selektion der Fluoreszenzsignale entlang der optischen Achse mittels Lochblenden, woraus sich ein hoher Justageaufwand für die Proben sowie die Etablierung eines leistungsfähigen Autofokussystems ergibt. Solche Systeme sind in der technischen Lösung hochkomplex und die erforderlichen Komponenten, zu denen Laser, Lochblenden, (gekühlte) Detektoren (z. B. PMT, Avalanche-Dioden, CCD-Systeme), hochgenaue mechanische Translationselemente und Optiken gehören, müssen mit erheblichem Aufwand integriert und aufeinander optimiert werden (beschrieben in US 5.459.325, US 5.192.980, US 5.834.758).

[0016] Es sind also Detektionssysteme bekannt, mit denen die molekulare Wechselwirkung eines mit einem Fluoreszenzmarker versehenen Targets und einer spezifischen Sonde, wie sie z. B. bei Sonden-Array basierten Experimenten auftritt, nachgewiesen werden kann. Trotz des beschriebenen hohen technischen Aufwands, der je nach Art und Aufbau des verwendeten Detektionssystems für die Minimierung des Signalauswuchens betrieben wird, kann dies nicht gänzlich beseitigt werden. Daher ist für die qualitative und quantitative Auswertung von gemessenen Fluoreszenzsignalen nach wie vor eine Referenzierung oder Kalibrierung der Experimente und der Detektionsgeräte mittels Fluoreszenzstandards notwendig. Eine Kalibrierung von Detektionssystemen mittels Fluoreszenzstandards wird durchgeführt, um u. a. Aussagen hinsichtlich der Sensitivität des räumlichen und zeitlichen Auflösungsvermögens und der geometrischen Bildfehler, wie z. B. der Bildfeldwölbung des jeweiligen Systems vornehmen zu können.

[0017] Die Kalibrierung von Detektionsgeräten hinsichtlich ihres zeitlichen Auflösungsvermögens ist notwendig, da zu Unterscheidung des eigentlichen (häufig langlebigen) Fluoreszenzsignals von (häufig kurzlebigen) Autofluoreszenzsignalen die Messung der Signale über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden muss.

[0018] Bei der Verwendung von CCD-Detektoren müssen mit Hilfe von Standards z. B. die Linearität und Sensitivität des Detektors im verwendeten Fluoreszenzwellenlängenbereich, das räumliche und zeitliche Auflösungsvermögen sowie die Bildfeldwölbung (Flatfieldbestimmung) des Detektors bestimmt werden. Konfokale Detektionssysteme müssen hinsichtlich der Bereiche, die angeregt bzw. zur Gesamtintensität beitragen, kalibriert werden.

[0019] Eine Kalibrierung von Experimenten mittels Fluoreszenzstandards ist notwendig, da die als Marker verwendeten Fluorophore hinsichtlich ihrer Fluoreszenzausbeute aufgrund der Umgebungsbedingungen, denen sie

ausgesetzt sind (z. B. Autofluoreszenz von Lösungskomponenten, pH-Wert, Temperatur, Bestrahlungszeit), beträchtlichen Schwankungen unterworfen sind und die absolute Quantifizierung von z. B. Hybridisierungsausbeuten auf Sonden-Arrays damit nur bedingt möglich ist.

[0020] Das Kalibrieren von verschiedenen Fluoreszenzdetektionssystemen mittels Fluoreszenzstandards ist auch deswegen sehr wichtig, da nur eine solche Kalibrierung einen Vergleich von Fluoreszenzsignalen von Experimenten, die mit unterschiedlichen Detektionssystemen aber auch Geräten eines Systems gemessen wurden, erlaubt (system- oder geräteübergreifender Vergleich).

[0021] Im Stand der Technik sind unterschiedliche Lehren bekannt, die eine Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionsystemen bzw. Fluoreszenzsignalen ermöglichen sollen.

[0022] Zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionsgeräten können z. B. Chips, die aus einer fluoreszierenden Plastikschicht bestehen, verwendet werden. Diese Eichstandards haben den Nachteil, dass sie keine Kalibrierung der Detektionssysteme hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens oder hinsichtlich deren dynamischen Eigenschaften über einen weiten Fluoreszenzbereich erlauben. Auch eine Bestimmung der Bildfeldwölbung von z. B. CCD-Detektoren ist mit diesen Standards nicht möglich, da aufgrund der Dicke des Chips eine Homogenisierung des Fluoreszenzsignals durch den Chip stattfindet. Damit ist eine Kalibrierung des Einflusses der geometrischen Verhältnisse auf die Detektion von Fluoreszenzsignalen, der insbesondere bei unterschiedlichen Detektionssystemen und Prinzipien eine entscheidende Rolle haben kann, weder geräte- noch systemübergreifend einstellbar.

[0023] Bei der Verwendung von CCD-basierten Fluoreszenzdetektoren und insbesondere bei der Anregung durch aufgeweitete oder strahlgeformte Laser oder multispektrale Beleuchtungssysteme wie z. B. Kaltlichtquellen sind zum Abgleich der Beleuchtungshomogenität bei der Verwendung von z. B. bewegten Streuscheiben aufwändige Berechnungen und Bildmanipulationen zur Definition des Flatfields nötig. Fluoreszenzstandards, die eine Definition des Flatfields zur Korrektur der Beleuchtungshomogenität bei solchen direkt abbildenden Systemen ermöglichen, sind aus dem Stand der Technik nicht bekannt.

[0024] Weiterhin gibt es Fluoreszenzstandards, die auf der Basis von dotierten Gläsern beruhen. Auch diese Standards haben den Nachteil, dass sie keine Kalibrierung der Detektionssysteme hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens bzw. hinsichtlich deren geometrischen Eigenschaften erlauben, da wegen der Dimensionen solcher Standards eine Homogenisierung der Signale durch das Volumen der Gläser stattfindet. Konfokale Systeme, bei denen nur bestimmte Bereiche und Schichten entlang der optischen Achse angeregt werden bzw. zur Gesamtintensität beitragen und das Problem von Transmissionsverlusten durch darüberliegende Strukturschichten besteht, können mit solchen Standards ebenfalls nicht hinsichtlich ihrer geometrischen Eigenschaften kalibriert werden.

[0025] In WO 01/06227 ist die Herstellung eines Fluoreszenzstandards auf der Basis von Mikro- bzw. Nanopartikeln und deren Anwendung zur Kalibrierung sowohl von Fluoreszenzdetektionssystemen als auch zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätssignalen in fluorometrischen Assays beschrieben. Diese Standards eignen sich ebenfalls nicht zur Kalibrierung der Fluoreszenzdetektionssysteme hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens. Damit ist ein geräteübergreifender Vergleich von aus Sonden-Array basierten Experimenten gewonnenen Signalintensitätsdaten nur bedingt möglich.

[0026] Um die kurzlebige Untergrundfluoreszenz (z. B.

von autofluoreszierenden Lösungsmittelmolekülen) von den eigentlichen Fluoreszenzsignal zu unterscheiden und das eigentliche Signal referenzieren zu können, können langlebig emittierende Markerstoffe als Standard verwendet werden, deren Signal durch zeitaufgelöste Detektionsmethoden nachgewiesen wird. Dabei handelt es sich häufig um phosphoreszierende Chelate der Seltenerdmetalle (insbesondere die des Europium oder Terrium). Diese Stoffe besitzen aber den Nachteil, dass sie nur mit UV-Lichtquellen angeregt werden können. Darüber hinaus sind die verwendeten Chelate in wässriger Form häufig instabil.

[0027] Um eine quantitative Auswertung von molekularen Wechselwirkungen bei Sonden-Array basierten Experimenten durch Fluoreszenzmessung und eine Normierung solcher Signale zu erreichen, werden zur Eichung bzw. Referenzierung die Experimente unter zweifacher Färbung der Sondenmoleküle, z. B. durch kompetitive Hybridisierung, durchgeführt (M. Shena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science*, 1995, 220,467-70 und D. Shalon, S. J. Smith, P. O. Brown, A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe for hybridization, *Genome Res.*, 1996, 6, 639-45). Da bei solchen Eichstandards die durch die Referenzmoleküle erhaltenen Signale stets von den konkreten experimentellen Bedingungen abhängig sind, ist ein quantitativer, geräte- oder systemübergreifender Vergleich schwer möglich.

[0028] Anhand der Nachteile der aus dem Stand der Technik bekannten Fluoreszenzstandards wird deutlich, dass ein großer Bedarf an Vorrichtungen besteht, die eine Kalibrierung von Fluoreszenzdetectionssystemen hinsichtlich deren räumlichen und zeitlichen Auflösungsvermögens sowie hinsichtlich deren geometrischen und dynamischen Eigenschaften ermöglichen.

[0029] Zusätzlich besteht ein großer Bedarf an Vorrichtungen zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen die den system- und geräteübergreifenden Vergleich und/oder den testübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen von z. B. Sonden-Array basierten Experimenten ermöglichen.

[0030] Die vorliegende Erfindung hat die Aufgabe, Vorrichtungen zur Verfügung zu stellen, die eine Referenzierung von Fluoreszenzsignalen hinsichtlich der gemessenen Intensität und/oder eine Kalibrierung von Fluoreszenzdetectionssystemen hinsichtlich deren Sensitivität, deren räumlichen und zeitlichen Auflösungsvermögens und/oder hinsichtlich deren geometrischen und dynamischen Eigenschaften erlauben. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Vorrichtungen zur Verfügung zu stellen, die leicht einen geräte- und systemübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen aus Experimenten, wobei es sich z. B. um Sonden-Array basierte Experimente handeln kann, ermöglichen. Ferner ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Fluoreszenzstandards zur Verfügung zu stellen, die einen testübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen erlauben. Schließlich ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Vorrichtungen zur Verfügung zu stellen, die eine Referenzierung bzw. Normierung von Fluoreszenzsignalen unter Berücksichtigung von Bleich- und Fluoreszenzlösungseffekten erlauben.

[0031] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Verfahren zur Herstellung von solchen Fluoreszenzstandards zur Verfügung zu stellen.

[0032] Zur Lösung dieser und weiterer Aufgaben, die sich aus der Beschreibung der Erfindung ergeben, dienen die Merkmale des unabhängigen Patentanspruchs. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen definiert.

[0033] Erfnungsgemäß werden die Aufgaben dadurch gelöst, dass auf einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Träger in definierten Bereichen mindestens eine Polymerschicht so aufgebracht ist, dass diese Bereiche nach entsprechender Bestrahlung fluoreszieren, wobei einige der aufgebrachten Polymerschichten sich hinsichtlich ihrer Dicke und/oder Zusammensetzung unterscheiden.

[0034] Solche erfungsgemäßen Vorrichtungen, die im Folgenden auch als Fluoreszenzstandard bzw. Standard bezeichnet werden, zeigen in den definierten Bereichen nach entsprechender Bestrahlung eine Fluoreszenz, deren Intensität vorbestimbar und reproduzierbar einstellbar ist. Damit können erfungsgemäß Fluoreszenzstandards zur Kalibrierung von verschiedenen Fluoreszenzdetectionssystemen hinsichtlich deren räumlichen und zeitlichen Auflösungsvermögens, hinsichtlich deren geometrischen und dynamischen Eigenschaften sowie hinsichtlich deren Sensitivität verwendet werden.

[0035] Da der Wellenlängenbereich der in den definierten Bereichen eines erfungsgemäßen Fluoreszenzstandards nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch Änderung der Zusammensetzung der Polymerschichten vorbestimbar und reproduzierbar einstellbar ist, können die erfungsgemäßen Fluoreszenzstandards zur Kalibrierung von verschiedenen Fluoreszenzdetectionssystemen hinsichtlich deren dynamischen Eigenschaften verwendet werden.

[0036] Die Polymerschichten von erfungsgemäßen Vorrichtungen werden in definierten Bereichen aufgebracht, deren Form und Größe vorbestimbar und reproduzierbar eingestellt werden kann. Solche Fluoreszenzstandards, die auch als strukturierte Fluoreszenzstandards bezeichnet werden, können zur Kalibrierung von unterschiedlichen Fluoreszenzdetectionssystemen hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens verwendet werden.

[0037] Da die Fluoreszenzeigenschaften der erfungsgemäßen Fluoreszenzstandards nur von der Dicke und/oder der Zusammensetzung der in den definierten Bereichen aufgebrachten Polymerschichten abhängen und z. B. nicht von Komponenten der Target-Lösungen beeinflusst werden, eignen sich die erfungsgemäßen Fluoreszenzstandards zur geräte- und detektionsübergreifenden und/oder zur testübergreifenden Bewertung und Referenzierung von Fluoreszenzsignalen, die z. B. bei Sonden-Array basierten Experimenten gemessen werden.

[0038] Bei den in den definierten Bereichen von erfungsgemäßen Vorrichtungen aufgebrachten Polymerschichten kann es sich um eine oder mehrere Polymerschichten handeln, die sich in ihrer Zusammensetzung und/oder Dicke unterscheiden. Die Polymerschichten bestehen aus mindestens einem fluoreszierenden Polymer oder aus einem Polymergemisch, wobei mindestens eine Polymerkomponente des Gemisches fluoreszierend ist. Bevorzugte fluoreszierende Polymere umfassen z. B. Positiv- und/oder Negativ-Photolacke auf Basis von Epoxidharzen wie z. B. SU8 und Novolacke und/oder PMMA und/oder photosensitives Polyimid und/oder Benzocyclobuten. Polymere, die für die Herstellung von erfungsgemäßen Fluoreszenzstandards geeignet sind, d. h. die nach entsprechender Bestrahlung eine Fluoreszenz zeigen, sind auch aus US 6,091,488 oder US 4,482,424 bekannt.

[0039] Die Polymerschichten von erfungsgemäßen Vorrichtungen können neben mindestens einem Polymer zusätzlich fluoreszierende Stoffe enthalten, bei denen es sich nicht um Polymere handelt. Da diese Stoffe in die Polymerschichten eingebettet sind, werden ihre Fluoreszenzeigenschaften von Umgebungsfaktoren (z. B. Komponenten der Target-Lösungen) nicht beeinflusst. Bevorzugt umfassen

solche fluoreszierenden Stoffe Chromophore, organische Farbstoffe wie z. B. Azofarbstoffe, Triphenylmethanfarbstoffe, Porphyrinfarbstoffe und/oder anorganische Farbstoffe wie z. B. metallische Farbstoffe und insbesondere Lanthanide.

[0040] Bei erfundungsgemäßen Vorrichtungen kann der Wellenlängenbereich der in den definierten Bereichen nach entsprechender Bestrahlung auftretenden Fluoreszenz durch die Wahl der Zusammensetzung der Polymerschichten eingestellt werden. In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung sind die auf einem nicht fluoreszierenden Träger in definierten Bereichen aufgebrachten Polymerschichten durch eine breitbandige Eigenfluoreszenz gekennzeichnet, so dass sie im sichtbaren Spektralbereich sowie im nahen IR- und UV-Bereich nach schmalbandiger Anregung Fluoreszenzsignale in einem Wellenlängenbereich größerer Anregung zeigen. In einer anderen bevorzugten Ausführung der Erfindung zeigen die Polymerschichten in den definierten Bereichen eine schmalbandige Eigenfluoreszenz, deren Wellenlängenbereich von der Zusammensetzung der Polymerschichten abhängt.

[0041] Bei einer bevorzugten Ausführung der Erfindung bestehen die Polymerschichten nur aus einem Polymer, so dass der Wellenlängenbereich der Fluoreszenz nur von diesem Polymer abhängt. In weiteren bevorzugten Ausführungen der Erfindung bestehen die Polymerschichten aus einem oder mehreren nicht fluoreszierenden Polymeren und/oder einem oder mehreren zusätzlichen fluoreszierenden Stoffen, so dass der Wellenlängenbereich der Fluoreszenz dieser erfundungsgemäßen Vorrichtungen von der Art und der Kombination der Polymere und/oder der fluoreszierenden Stoffe abhängt.

[0042] Erfundungsgemäß kann die Intensität der von einer Polymerschicht in einem definierten Bereich nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz auf vielfältige Weise vorbestimbar eingestellt werden. Die Intensität der in den definierten Bereichen nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz ist erfundungsgemäß durch die Zusammensetzung der Polymerschichten und/oder die Dicke der Polymerschichten einstellbar. Erfundungsgemäß ist unter der Dicke einer Polymerschicht in einem definierten Bereich sowohl die Dicke der einzelnen Polymerschichten in einem Bereich, wenn in einem Bereich mehrere Polymerschichten aufgebracht sind, als auch die Dicke, die sich aus der Summe der Dicke der einzelnen Polymerschichten in einem Bereich ergibt, zu verstehen.

[0043] Bei einer bevorzugten Ausführung der Erfindung erfolgt die Einstellung der Intensität in einem definierten Bereich durch das sukzessive Aufbringen von Polymerschichten einheitlicher Zusammensetzung in diesem Bereich. Die in diesem Bereich entstehende Polymerschicht zeigt eine einheitliche Zusammensetzung. Entsprechend können erfundungsgemäß Fluoreszenzstandards hergestellt werden, die in allen definierten Bereichen Polymerschichten einheitlicher Zusammensetzung, aber unterschiedlicher Schichtdicke tragen. In einer besonders bevorzugten Ausführung der Erfindung können auf diese Weise Fluoreszenzstandards hergestellt werden, bei denen die Intensität der in einem Bereich nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz sich proportional zu der Dicke der in dem jeweiligen Bereich aufgebrachten Polymerschicht verhält.

[0044] Die Intensität der Fluoreszenz in den definierten Bereichen von erfundungsgemäßen Eichstandards ist auch durch Änderung der Zusammensetzung der Polymerschichten einstellbar. Unter Zusammensetzung der Polymerschichten wird dabei erfundungsgemäß die Art und Anzahl der Polymerkomponenten in einer Polymerschicht und/oder der

zusätzlichen fluoreszierenden Stoffe sowie Menge der Polymerkomponenten und/oder zusätzlichen fluoreszierenden Stoffe pro Flächeneinheit verstanden.

[0045] In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung 5 werden Polymerschichten einheitlicher Dicke in verschiedenen definierten Bereichen aufgebracht, wobei die Polymerschichten sich nur hinsichtlich der Menge der zusätzlichen fluoreszierenden Teilchen pro Flächeneinheit unterscheiden. Auf diese Weise sind erfundungsgemäß Fluoreszenzstandards herstellbar, bei denen die Intensität der in den Bereichen bei entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz sich bei gleicher Schichtdicke proportional zu 10 der Menge der fluoreszierenden Teilchen in den verschiedenen definierten Bereichen verhält. In einer anderen bevorzugten Ausführung der Erfindung kann damit bei konstanter Konzentration der fluoreszierenden Teilchen im Polymer durch Änderung der Schichtdicke quasi linear die resultierende Intensität eingestellt werden.

[0046] Eine weitere Möglichkeit zur Einstellung der Intensität von erfundungsgemäß hergestellten Fluoreszenzstandards besteht darin, während des Herstellungsprozesses die erfundungsgemäßen Polymerschichten physikalischen Behandlungsmethoden wie Bestrahlung und Temperaturbehandlung (Tempern) zu unterwerfen. Ohne an eine 20 Hypothese gebunden sein zu wollen, wird momentan davon ausgegangen, dass durch diese Behandlungsmethoden der Vernetzungs- bzw. Quervernetzungsgrad der Polymerschichten und entsprechend die Fluoreszenzeigenschaften der Polymerschichten verändert werden. Der Begriff Vernetzungs- bzw. Quervernetzungsgrad ist dem Fachmann geläufig. Für die Einstellung der Intensität von Polymerschichten durch Verfahren zur Veränderung des Vernetzungsgrads, eignen sich insbesondere Polymere, die eine duroplastische Vernetzung aufweisen wie z. B. die erwähnten Photolacke 30 wie SU8.

[0047] Erfundungsgemäß können durch das sukzessive Aufbringen von Polymerschichten unterschiedlicher Dicke und/oder unterschiedlicher Zusammensetzung und/oder unterschiedlichen Quervernetzungsgrads in mehreren definierten Bereichen auf ein und dem selben Träger Fluoreszenzstandards hergestellt werden, die sich durch eine große Bandbreite sowohl hinsichtlich der Intensitäten als auch der Wellenlängenbereiche der nach entsprechender Bestrahlung auftretenden Fluoreszenz unterscheiden. Solche erfundungsgemäß Fluoreszenzstandards sind vielfältig zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren räumlichen und zeitlichen Auflösungsvermögens sowie deren dynamischen und geometrischen Eigenschaften einsetzbar. Solche erfundungsgemäß Vorrichtungen können auch als Fluoreszenzstandards verwendet werden, die leicht einen Vergleich von Fluoreszenzsignalen zwischen unterschiedlichen Detektionssystemen, aber auch Geräten eines Systems zulassen.

[0048] Die Fluoreszenzeigenschaften, wie z. B. die Quantenausbeute der fluoreszierenden Bereiche sind wegen der chemischen und physikalischen Eigenschaften der verwendeten Polymere und zusätzlichen fluoreszierenden Stoffe über die Bestrahlungszeit Änderungen unterworfen, so dass sich die resultierende Intensität nach einer gewissen Zeit der Nutzung verringert (Bleichen, siehe auch Miehler, 1992, Kunststoff-Mikromechanik: Morphologie, Deformations- und Bruchmechanismen., Hanser, München/Wien).

[0049] Erfundungsgemäß können die in definierten Bereichen abgelegten Polymerschichten durch geeignete Herstellungsprotokolle (z. B. durch so genannte Tcmperprotokolle) hinsichtlich ihrer Intensitätsveränderungen über die Zeit derart optimiert werden, dass diese Veränderungen linear sind und demzufolge die Intensitätsverhältnisse der resultie-

renden Fluoreszenz der einzelnen definierten Bereiche des strukturierten Standards konstant bleiben.

[0050] Solche erfundungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards können für die Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionsgeräten hinsichtlich deren zeitlichen Auflösungsvermögens und zur Normierung von Experimenten hinsichtlich ihres zeitlichen Verlaufs verwendet werden. Da bei solchen erfundungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards die Veränderungen der Intensität über die Zeit linear sind, können diese Standards auch für die Normierung von Experimenten auf Detektionsgeräten verwendet werden, deren optische Eigenchaften zeitlichen Änderungen (z. B. Laser- oder Lampenleistung) unterworfen sind.

[0051] Als bevorzugte Ausführungsformen können damit auch erfundungsgemäße Fluoreszenzzeichstandards hergestellt werden, deren Fluoreszenzausbeute über die Bestrahlungsdauer und den Alterungsprozess linear bzw. hinreichend vorbestimbar beschrieben werden kann. Solche Fluoreszenzzeichstandards können z. B. zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen von Experimenten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden, verwendet werden. Außerdem erlauben sie den geräte- und systemübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen.

[0052] In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung werden die Polymerschichten in definierten Bereichen unterschiedlicher Form und/oder Größe auf einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Träger aufgebracht. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen haben diese definierten Bereiche eine quadratische, rechteckige und/oder kreisförmige Gestalt, deren Seitenlängen bzw. Durchmesser sich zwischen 500 nm und 5 mm bewegen.

[0053] Solche erfundungsgemäßen strukturierten Fluoreszenzzeichstandards können zur Kalibrierung von unterschiedlichen Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens verwendet werden. Unter räumlichem Auflösungsvermögen ist dabei erfundungsgemäß die Separierbarkeit zweier abgebildeter fluoreszierender Punkte zu verstehen.

[0054] Da erfundungsgemäße Fluoreszenzzeichstandards hergestellt werden können, deren definierte Bereiche Maßtoleranzen im 10 nm-Bereich aufweisen, können solche Fluoreszenzzeichstandards bei mikroskopischen Techniken, wie z. B. der konfokalen 3-D-Mikroskopie als Normierungsinstrument für laterale und axiale Distanzen verwendet werden.

[0055] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die definierten Bereiche in Array-Form auf dem Träger aufgebracht, d. h. dass mehrere definierte Bereiche gleicher Größe und Form zu einem Array-Element gruppiert sind, wohingegen Bereiche anderer Form und/oder Größe zu anderen Array-Elementen gruppiert sind.

[0056] In bevorzugten Ausführungsformen der erfundungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards kann die Dicke der Polymerschichten so eingestellt werden, dass die maximale Dicke der verschiedenen Polymerschichten in einem Bereich deutlich geringer ist als die minimale Fokustiefe handelsüblicher konfokaler Detektionssysteme. Erfundungsgemäß sollten solche Fluoreszenzzeichstandards eine bevorzugte Schichtdicke zwischen wenigen Nanometern und maximal 50 Mikrometern aufweisen, bevorzugt sollten die Schichtdicken zwischen einigen nm und 20 µm, zwischen 100 nm und 10 µm, besonders bevorzugt zwischen 200 nm und 5 µm liegen. Unter Fokustiefe ist erfundungsgemäß der Bereich entlang der optischen Achse zu verstehen, in dem eine Detektion von Fluoreszenzsignalen möglich ist. Dieser Bereich wird bei konventioneller Mikroskopie durch die numerische Apertur und bei konfokaler Scanningmikroskopie durch die Größe der Lochblenden (Pinholes) bestimmt. Sol-

che erfundungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards können zur Kalibrierung von physikalischen Aufbauten und Geräten, zur Erfassung von Fluoreszenzsignalen sowie zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen entsprechend markierte 5 Substanzen und Substanzgruppen verwendet werden.

[0057] Die Polymerschichten werden erfundungsgemäß auf im Wesentlichen nicht fluoreszierenden, bevorzugt optisch durchlässigen Trägern aufgebracht. Bei bevorzugten Ausführungen der Vorrückung bestehen diese Träger aus 10 Glas, besonders bevorzugt aus Quarzglas und Borosilicatglas oder aus optisch durchlässigen, nicht fluoreszierenden polymeren Scheiben, besonders bevorzugt aus Polycarbonat, PMMA und/oder Folien. Als Träger eignen sich unter Umständen auch optisch nicht transparente Materialien, die im 15 Wesentlichen keine Eigenfluoreszenz aufweisen.

[0058] In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung sind die Fluoreszenzzeichstandards mit weiteren Trägersystemen verbunden. Diese Trägersysteme bestehen aus ebenfalls im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Materialien. 20 Bevorzugt handelt es sich dabei um optisch durchlässige Materialien wie Glas, besonders bevorzugt um Quarzglas, aber auch um optisch nicht transparente Materialien wie Plastik und/oder Metall, die im Wesentlichen keine Eigenfluoreszenz aufweisen.

[0059] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei diesem Trägersystem um einen handelsüblichen Objektträger, wie er für z. B. für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet wird. Auf solchen Trägern können z. B. Zellen oder Gewebeabschnitte immobilisiert und 30 durch Abgleich der Signale gegen den erfundungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandard direkt ausgewertet werden.

[0060] Eine Integration der erfundungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards kann z. B. auch direkt auf den Trägern erfolgen, auf denen Substanzbibliotheken in Form eines Sonden-arrays abgelegt sind oder werden. Solche Fluoreszenzzeichstandards erlauben eine unmittelbare Referenzierung von Fluoreszenzsignalen und ermöglichen so die Bewertung von testspezifischen Untersuchungen. Zur Anbindung der Substanzbibliotheken kann die Oberfläche der Träger in 35 mindestens den Bereichen, die die Substanzbibliothek enthalten sollen, durch Amino-, Carboxy-, Aldehyd- oder Epoxidgruppen funktionalisiert sein. Weitere funktionelle Gruppen zur Anbindung von Substanzbibliotheken sind dem Fachmann bekannt.

[0061] Dabei sind erfundungsgemäß die Träger, auf denen die Fluoreszenzzeichstandards bzw. die Substanzbibliotheken in Form von Sondenarrays abgelegt werden, so zu wählen, dass sie im Wesentlichen nicht fluoreszierend und, wenn benötigt, optisch durchlässig sind. Bevorzugte Materialien 40 für die Herstellung von solchen Trägern sind Glas; besonders bevorzugt Quarzglas, Borosilicatglas und/oder Polymere und/oder Silicium. Es können auch Materialien gewählt werden, die optisch nicht durchlässig sind, aber im Wesentlichen nicht fluoreszierend sind.

[0062] Bei der Integration der erfundungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards in Sondenarrays können diese Sondenarrays durch Substanzbibliotheken auf Protein-, Peptid- oder Nukleinsäurebasis funktionalisiert sein. Bevorzugt handelt es sich bei den Proteinsubstanzbibliotheken, mit denen die erfundungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards funktionalisiert sind, um Antikörerbibliotheken, um Rezeptorbibliotheken, Rezeptor-Ligand-Bibliotheken und/oder Hormonbibliotheken.

[0063] Bei den Peptidbibliotheken, mit denen erfundungsgemäß Fluoreszenzzeichstandards funktionalisiert sind, handelt es sich üblicherweise um pharmazeutisch oder biologisch aktive Peptide, um Antigenbibliotheken und/oder um Rezeptor-Ligand-Bibliotheken und/oder um Hormonbiblio-

theken.

[0064] Bei den Nukleinsärebibliotheken, mit denen erfundungsgemäß Fluoreszenzzeichnungsstandards funktionalisiert sind, handelt es sich bevorzugt um DNA-Molekül-Bibliotheken und/oder RNA-Molekülbibliotheken. Besonders bevorzugt handelt es sich um mRNA-Bibliotheken, um rRNA-Bibliotheken, um genomische DNA-Bibliotheken und/oder cDNA-Bibliotheken und/oder Plasmide.

[0065] In einer bevorzugten Ausführungsform können erfundungsgemäß Fluoreszenzzeichnungsstandards direkt in die Fluoreszenzdetektionssysteme integriert werden, so dass eine online-Kalibrierung der Geräte möglich ist. Da die Eigenschaften der erfundungsgemäßen Fluoreszenzzeichnungsstandards durch den Herstellungsprozess und durch die Zusammensetzung und Dicke der Polymerschicht sowie die Größe und Form der definierten Bereiche, in denen die Polymerschichten, die nach entsprechender Bestrahlung fluoreszieren, aufgebracht sind, vorbestimmbar einstellbar sind, können die mit verschiedenen Detektionssystemen gemessenen Fluoreszenzintensitäten von Sonden-Array basierten Experimenten system- und geräteübergreifend direkt miteinander verglichen werden.

[0066] Die erfundungsgemäßen Fluoreszenzzeichnungsstandards können auch als universelles externes Werkzeug verwendet werden, um mehrere unterschiedliche Detektionssysteme in der beschriebenen Weise zu kalibrieren.

[0067] Erfundungsgemäß Fluoreszenzzeichnungsstandards können auch in geschlossene Kammer-systeme (z. B. PCR- und/oder Hybridisierungskammern) integriert sein.

[0068] Erfundungsgemäß Fluoreszenzzeichnungsstandards können nach Verfahren hergestellt werden, bei denen die nach Bestrahlung fluoreszierenden Schichten gezielt in definierten Bereichen auf erfundungsgemäßen Träger aufgebracht werden. Solche Verfahren sind z. B. aus der Halbleitertechnik bekannt (US 6,091,488). Die Polymerschichten von erfundungsgemäß Fluoreszenzzeichnungsstandards können bevorzugt durch photolithographische Verfahren, durch Spotten, durch Trockenätzen, durch Ionenimplantation, durch drucktechnische Verfahren, durch Walzen, durch Spritzgießen oder durch Oberflächenprägung auf den Träger aufgebracht werden.

[0069] Allgemein können die erfundungsgemäßen Polymerschichten, die auch als funktionelle Polymerschichten bzw. als Funktionsschichten bezeichnet werden, durch chemische und/oder physikalische Methoden zur Beschichtung auf dem Träger aufgebracht werden. Bei chemischen Methoden kann die Aufbringung der Polymerschichten dabei aus der Gasphase (z. B. durch CVD oder Oxidation), aus der Flüssigphase (z. B. durch elektrolytische, elektrochemische und andere nasschemische Verfahren) oder aus der Festphase (z. B. durch Oxidation) erfolgen. Bei physikalischen Methoden kann die Aufbringung aus der Gasphase oder aus dem Plasma (z. B. durch PVD, Sputtern oder Bedampfen), aus der Flüssigphase (z. B. durch Spin-On-Verfahren, durch Lackieren, Spritzen oder Tauchen) oder aus der Festphase (z. B. durch Lamination) erfolgen. Es können auch Kombinationen dieser Verfahren oder nachträgliche Modifikationen wie Ionenimplantation angewandt werden (z. B. PECVD). Die jeweiligen Methoden und entsprechende Ausgestaltungen sind dem Fachmann bekannt (siehe z. B. W. Menz, J. Mohr, Mikrosystemtechnik für Ingenieure, VCH, 1997).

[0070] Die erfundungsgemäßen Polymerschichten können durch verschiedene Verfahren strukturiert werden, die dem Fachmann bekannt sind. Dabei kann es sich um biochemische Methoden handeln, wie z. B. die enzymatisch vermittelte selektive Strukturierung (in WO98/08086 beschrieben), aber auch um chemische und/oder mikrotechnische

Verfahren. Zu diesen gehören selektives Ätzen der Funktionsschicht gegen eine Maskierung, die selbst gegen den Ätzer unempfindlich ist (z. B. Flüssig- oder Trockenätzen). Ebenfalls anwendbar sind Verfahren, die selektive Eigenschaftsveränderungen durch Strahlung, wie z. B. durch Bestrahlung mit UV oder Lasern bewirken. Dazu zählt die Photolithographie. Andere Methoden umfassen self-assembling layers. Diese Methoden können unter Verwendung einer Maskierung, aber auch durch "direkt schreibende"

Vorrichtungen (Spulen) durchgeführt werden. Drucktechnische Verfahren wie Spotten oder Offseidruck oder andere Verfahren wie Walzen, Stempeln, Spritzgießen oder Oberflächenprägungsverfahren können ebenfalls verwendet werden. Unterschiedliche Ausführungsformen der Methoden sind dem Fachmann bekannt (siehe z. B. W. Menz, J. Mohr, Mikrosystemtechnik für Ingenieure, VCH, 1997).

[0071] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Polymerschichten durch negative oder positive photolithographische Verfahren, besonders bevorzugt durch negative

photolithographische Verfahren aufgebracht. Besonders bevorzugt sind negative photolithographische Verfahren, bei denen die Polymerschichten nach Bestrahlung im Entwickler unlöslich werden. Unbelichtete Bereiche bleiben dagegen im Entwickler löslich und können entfernt werden. Solche photolithographische Verfahren zur Strukturübertragung mittels eines Photoresists sind dem Fachmann bekannt. Dabei sind chemische und physikalische Verfahren, die das Aufbringen einer homogenen Funktionsschicht auf dem Träger erlauben, bevorzugt. Besonders bevorzugte Verfahren umfassen CVD-, PVD- und Spin-On-Verfahren.

[0072] Die Parameter, durch deren Wahl bei photolithographischen Verfahren (aber auch anderen Verfahren) die Dicke der Polymerschichten eingestellt werden kann, umfassen die Bearbeitungsparameter (Verfahrensparameter) wie die Umlaufgeschwindigkeit, die Dauer des Herstellungsprozesses, die Viskosität des Polymers, die Temperatur und/oder die Luftfeuchtigkeit. Bei der Verwendung von Photopolymeren umfassen die Bearbeitungsparameter auch die Bestrahlungsdosis, die Parameter des Entwicklungsprozesses und den Temperprozess.

[0073] Bei photolithographischen Verfahren kann die Form und Größe der definierten Bereiche, in denen die Polymerschichten aufgebracht werden, durch Verwendung einer Maske und/oder Lochmasken, z. B. durch Verwendung einer Maske im 1 : 1 Maßstab festgelegt werden. Je nach Aussparung der Maske sind damit erfundungsgemäß verschiedene geometrische Formen und Größen für die definierten Bereiche einstellbar. Ebenfalls können nach diesem Verfahren erfundungsgemäß Fluoreszenzzeichnungsstandards hergestellt werden, bei denen die in verschiedenen definierten Bereichen abgelegten Polymerschichten eine Array-Form aufweisen. Als Lochmasken wird bevorzugt strukturiertes Chrom auf Glas und/oder Quarz verwendet.

[0074] Durch Wiederholen des photolithographischen Verfahrens können erfundungsgemäß Fluoreszenzzeichnungsstandards hergestellt werden, bei denen in verschiedenen Bereichen Polymerschichten mit unterschiedlicher Zusammensetzung und/oder Dicke aufgebracht sind. Durch Ändern der Temper- und/oder Bestrahlungsprotokolle, die bei photolithographischen Verfahren verwendet werden, kann zudem der Vernetzungsgrad (und damit die Intensität) der Polymerschichten in definierten Bereichen gezielt geändert werden. Durch Ändern der Temperprotokolle können ebenfalls das Bleichverhalten von erfundungsgemäß Fluoreszenzzeichnungsstandards gezielt eingesetzt werden.

[0075] Um erfundungsgemäß hergestellte Fluoreszenzzeichnungsstandards mit einem z. B. optisch durchlässigen, im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Trägersystem zu ver-

binden, können alle Verfahren verwendet werden, die den Eichstandard mit dem Trägersystem verbinden und die Eigenschaften des Fluoreszenzzeichstandards nicht negativ beeinflussen. Zur Montage ist es notwendig, die Oberfläche der Standards durch geeignete Verfahren und Vorrichtungen in die Ebene von Probenträgern derart auszurichten, dass eine eindeutige Zuordnung der Lage der fluoreszierenden Schichten in Höhe und örtlicher Lage bezüglich definierter Bereiche des Trägers (z. B. Außenkanten) möglich ist. Dazu sind z. B. temporäres Aufkleben oder Vakuumeinrichtungen geeignet. Bevorzugt wird der Fluoreszenzzeichstandard auf dem Trägersystem durch Kleben, durch Lagejustage oder durch ein Vakuumsystem aufgebracht.

[0076] Bei der Herstellung solcher erfindungsgemäßer Fluoreszenzzeichstandards ist zu berücksichtigen, dass die Methoden zur Assemblierung der Fluoreszenzzeichstandards und der Sonden-Arrays die Funktion der Bauelemente nicht negativ beeinflussen. Dementsprechend ist zu gewährleisten, dass z. B. die verwendeten Klebstoffe keine Autofluoreszenz zeigen und durch die verwendeten Bauteile keine wesentlichen Streuungen oder Reflexionen auftreten.

[0077] Werden die Fluoreszenzzeichstandards z. B. mit Substanzbibliotheken als Sonden-Arrays funktionalisiert, kann der Fluoreszenzzeichstandard mit dem Trägersystem, auf dem sich die Substanzbibliotheken befinden, verbunden sein.

[0078] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform können die Fluoreszenzzeichstandards auf Trägern zunächst im Waver-Maßstab gefertigt werden und die entsprechend vereinzelten Fluoreszenzzeichstandards dann durch Ablegen von Substanzbibliotheken in Array-Form funktionalisiert werden.

[0079] Die erfindungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards lassen sich in unterschiedlicher Art und Weise zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetectionssystemen einsetzen. Durch die Verwendung von erfindungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards für gerätespezifische Kalibrierungen lassen sich die Geräteeigenschaften definieren. Zum Beispiel kann die entsprechende Form und Größe der definierten Bereiche, in denen die nach entsprechender Bestrahlung fluoreszierenden Polymerschichten abgelegt sind, zur Bestimmung des räumlichen Auflösungsvermögens verwendet werden. Erfindungsgemäße Fluoreszenzzeichstandards, die in mehreren definierten geometrischen Bereichen Polymerschichten unterschiedlicher Dicke, aber einheitlicher Zusammensetzung aufweisen, wodurch die nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufene Intensität der Fluoreszenz in den verschiedenen Bereichen sich proportional zur Polymerschichtdicke verhält, erlauben eine Kalibrierung eines entsprechenden Detektionssystems hinsichtlich seiner dynamischen Eigenschaften. Erfindungsgemäß wird unter dynamischen Eigenschaften der Bereich auswertbarer Fluoreszenzintensitäten bei einer Messung verstanden. Z. B. lässt sich so der Intensitätsbereich festlegen, in dem ein CCD-Detektor linear arbeiten soll. Solche erfindungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards können auch für die Einstellung der Sensitivität des Detektionssystems verwendet werden, d. h. der Festlegung, welche minimalen oder maximalen Fluoreszenzintensitäten ein Detektionssystem noch als Signal werten soll.

[0080] Erfindungsgemäße Fluoreszenzzeichstandards, bei denen die nach entsprechender Bestrahlung in verschiedenen geometrischen Bereichen mit Polymerschichten unterschiedlicher Dicken und/oder Zusammensetzung hervorgerufene Intensität der Fluoreszenz vorbestimbar und regulierbar abklingt, können benutzt werden, um Rückschlüsse auf das gerätespezifische Bleichen von Fluoreszenzsignalen zu ziehen.

[0081] Ferner können erfindungsgemäße Fluoreszen-

zeichstandards zur Kalibrierung der geometrischen Eigenschaften von Detektionssystemen, insbesondere zur Korrektur der Bildfeldwölbung (Flatfieldbestimmung) bei CCD-Detektoren verwendet werden.

- 5 [0082] Erfindungsgemäß wird unter geometrischen Eigenschaften allgemein die örtliche Auflösung, der Abbildungsmaßstab, die Bildfeldwölbung und andere geometrische Fehler, die aus der optischen Konstruktion resultieren, verstanden.
- 10 [0083] Da die Fluoreszenzeigenschaften von erfindungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards nicht von äußeren Faktoren abhängen und vorbestimbar und reproduzierbar einstellbar sind, können sie verwendet werden, um verschiedene Geräte des gleichen Detektionsprinzips (geräteübergreifende Kalibrierung) oder Geräte unterschiedlichen Detektionsprinzips (systemübergreifende Kalibrierung) zu kalibrieren. Die Kalibrierung kann dabei auf Normwerte, die z. B. in Arbeitsgruppen und Labors verwendet werden, erfolgen, auf die dann Fluoreszenzsignale aus experimentellen Messungen bezogen werden.
- 15 [0084] Damit sind die Signale, die bei der Auswertung z. B. eines Sonden-Array basierten Experiments mit unterschiedlichen Detektionssystemen erhalten werden, direkt vergleichbar (testübergreifender Vergleich).
- 20 [0085] Erfindungsgemäße Fluoreszenzzeichstandards, die eine große Bandbreite hinsichtlich der Wellenlänge und Intensität der nach Bestrahlung der Polymerschichten in den definierten Bereichen hervorgerufenen Fluoreszenz zeigen, können auch für testspezifische Referenzierung von Fluoreszenzsignalen verwendet werden. Dies ist möglich, weil die testspezifischen Signale z. B. auf die Fluoreszenz eines definierten Bereichs bezogen werden können, deren Eigenschaften in dem Bereich des Testsignals liegen. Damit ist eine Normierung der Testsignale möglich. Die unter Verwendung von erfindungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards erhaltenen normierten experimentellen Daten sind signifikant der Fehler, welche aus der Verwendung unterschiedlicher Detektoren bzw. verschiedener Einstellungen der Detektoren resultieren, behoben. Sie können daher direkt miteinander verglichen werden. Damit ermöglichen erfindungsgemäße Fluoreszenzzeichstandards den testübergreifenden und geräteübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalintensitäten, die bei der Durchführung von Sonden-Array basierten Experimenten und Tests erhalten worden sind.
- 25 [0086] Üblicherweise werden die Einstellungen von Scannern den entsprechenden Messergebnissen angepasst. Sind bei einem Sonden-Array basierten Experiment die resultierenden Fluoreszenzsignale schwach, werden die Laserleistung oder die Sensitivität des Detektors (z. B. die Vorspannung bei Verwendung eines PMT-Systems oder die Integrationszeit bei Verwendung eines CCD-Systems) erhöht. Außerdem unterliegen die Geräte gerätespezifischen Schwankungen. Dies ist insbesondere kritisch, wenn Ergebnisse aus unterschiedlichen Zeiträumen verglichen werden sollen, da z. B. bei Laserscannern die Leistung der eingesetzten Laser sich dramatisch ändern kann. Ein Vergleich von Fluoreszenzintensitätssignalen, die zwar bei der Durchführung von gleichartigen Sondenarray-basierten Experimenten, aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen wurden, ist mit erfindungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards problemlos möglich ("time to time"-Vergleich), da über das Bleichverhalten des Standards die altersbedingten Geräteschwankungen normiert werden können. Damit können mit Hilfe von erfindungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards Detektionsysteme auch hinsichtlich ihrer Alterungseigenschaften, wie z. B. der Änderung der Lampenleistungen kalibriert werden.
- 30 [0087] Sollen die Fluoreszenzsignale, die bei der Durchführung von verschiedenen Sonden-Array basierten Experi-

mienten gemessen wurden, miteinander verglichen werden, stellen für die Bewertung der Ergebnisse insbesondere die Inhomogenität der biochemischen und fluidischen Prozesse in der Probe sowie die Schwierigkeiten bei der Spurenkennung während der Auswertung ein erhebliches Problem dar. Diese Probleme erschweren den qualitativen Vergleich verschiedener Sonden-Arrays. Erfindungsgemäße Fluoreszenzstandards erlauben eine erhebliche Einschränkung der Fehler und qualitative Vergleiche von Ergebnissen, die bei der Durchführung von Experimenten mit verschiedenen Sonden-Arrays an demselben Gerät, durchgeführt wurden, werden möglich ("test to test"-Vergleich).

[0088] Da mit dem dargestellten Fluoreszenzstandard auch unterschiedliche Detektionssysteme kalibriert werden können, können die Ergebnisse von Sonden-Array basierten Experimenten geräte- und system- und damit auch laborübergreifend analysiert werden.

[0089] Vorrichtungen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass auf einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Träger in einem oder mehreren definierten Bereichen Polymerschichten, die hinsichtlich ihrer Schichtdicke und Zusammensetzung einheitlich sind, aufgebracht sind, können ebenfalls zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen verwendet werden. Solche Vorrichtungen eignen sich insbesondere, wenn sie über mehrere definierte Bereiche verfügen, zur geräte- und systemübergreifenden Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens.

[0090] Die Polymerschichten solcher Vorrichtungen können erfindungsgemäß die gleiche Zusammensetzung wie oben ausgeführt aufweisen, d. h. sie können fluoreszierende Polymere, Polymergemische mit mindestens einem fluoreszierenden Polymer und/oder zusätzliche fluoreszierende Stoffe enthalten.

[0091] Bei diesen Vorrichtungen sind die Intensität und der Wellenlängenbereich der in den Bereichen nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz gleichermaßen durch die Wahl der Zusammensetzung der Polymerschichten, der Schichtdicke und durch Veränderungen des Quervernetzungsgrads vorbestimbar und reproduzierbar einstellbar. Auch alle anderen Eigenschaften wie Bleichverhalten, Größe und Form der definierten Bereiche sind auf die oben beschriebene Art und Weise einstellbar. Ebenso können solche Vorrichtungen durch allen oben dargestellten Verfahren hergestellt werden.

[0092] Solche Vorrichtungen können generell zur qualitativen und quantitativen Referenzierung von Fluoreszenzsignalen, besonders bevorzugt zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen aus Sonden-Array basierten Tests und/oder zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen verwendet werden.

[0093] Besonders bevorzugt können sie zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens verwendet werden. Da die in einem oder mehreren definierten Bereichen aufgebrachten Polymerschichten hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Schichtdicke einheitlich sind, eignen sie sich nicht zur Kalibrierung der dynamischen Eigenschaften von Fluoreszenzdetektionssystemen. Auch eine Kalibrierung von Detektionssystemen über den Vergleich der Verhältnisse von unterschiedlichen Intensitäten, die nach Bestrahlung von unterschiedlichen Bereichen auftreten, ist mit diesen Vorrichtungen nicht möglich.

[0094] Solche Vorrichtungen können aber z. B. zum Abgleich von experimentell ermittelten Fluoreszenzsignaldaten auf Normwerte verwendet werden und erlauben so, den geräte- und systemübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen. Diese Vorrichtungen erlauben auch die Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren Sensitivität und deren gerätespezifischen Bleichverhaltens bei denen durch die Zusammensetzung und Dicke der Polymerschichten festgelegten Intensitäten und Wellenlängenbereichen.

[0095] Im Folgenden sind Beispiele dargestellt, die besonders bevorzugte Ausführungsformen bzw. Verwendungen von erfindungsgemäßen Fluoreszenzstandards darstellen. Die Beispiele sind in keiner Weise einschränkend zu deuten.

Beispiel 1

[0096] Photolithographische Herstellung eines erfindungsgemäßen Fluoreszenzstandards im Wafermaßstab (Abb. 1):

Im Beispiel wird gezeigt, wie ein erfindungsgemäßer universeller Fluoreszenzstandard auf polymerer Basis durch negative Photolithographie hergestellt wird. Dabei wird ein erfindungsgemäßer Fluoreszenzstandard hergestellt, der in unterschiedlichen Bereichen gleicher Form und Größe Polymerschichten unterschiedlicher Dicke, aber im Wesentlichen gleicher Zusammensetzung trägt. Damit sind die Intensitäten der in den Bereichen nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz proportional zur Schichtdicke.

[0097] Als Träger werden Materialien, die im gewünschten Fluoreszenzspektrum eine hohe Transparenz und geringe Eigenfluoreszenz zeigen, benutzt. Im vorliegenden Fall wurde Borofloatglas40 der Firma Schott (BF40, Durchmesser: 100 mm, Dicke: 0,7 mm) als Trägermaterial gewählt. Das eigentliche Funktionsmaterial (dies sind die Polymerschichten) sollte dagegen eine starke Eigenfluoreszenz aufweisen. Im gewählten Ausführungsbeispiel wurde als Polymer SU8-10, gelöst in PGMEA (organisches Lösungsmittel der Firma Sigma), gewählt, das die genannten Eigenschaften erfüllt. SU8-10 ist ein negatives, epoxy-basiertes Photopolymer, das bei UV-Bestrahlung unter 365 nm polymerisiert (US 4 882 245). Die Eigenfluoreszenz und die Photostrukturierbarkeit haben den großen Vorteil, dass das gewählte Polymer durch photolithographische Verfahren strukturiert werden kann.

[0098] Zu Beginn des Herstellungsprozesses wurde das Trägermaterial getempert (180°C, 20 min). Dadurch wurden etwaige Adsorbate (oft H₂O) entfernt, die eine gute Haftung der SU8 Polymerschicht auf dem Substrat behindern. Um dies zu verstärken, wurde die Oberfläche des Substrats mit 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan modifiziert.

[0099] Auf das Substrat wurde dann eine erste Schicht mit einer Dicke entsprechend der gewünschten Fluoreszenz bzw. der gesuchten Sensitivität aufgebracht (siehe Abb. 1). Dafür wurde das Spin-On-Verfahren verwendet, wobei durch Wahl der Parameter (Dauer: 305, Umdrehungsgeschwindigkeit: 5000 rpm, Beschleunigung: 100 rpm/s für 10 s und 1000 rpm/s für 20 s, Grad der Verdünnung mit PGMEA) die gewünschte Dicke bzw. die Fluoreszenz eingestellt wurde. Dadurch wurde das Polymer homogen auf dem Substrat verteilt und das Lösungsmittel ausgetrieben. Die nachfolgende Temperung oberhalb des Glaspunktes (95°C, 15 min, sogenanntes Pre-Bake) formiert und homogenisiert die Schicht.

[0100] Die Polymerschichten wurden danach mittels üblicher Mikrophotolithographie strukturiert. Dazu wurde durch Bestrahlung des Photopolymers mit UV-Licht (15 min bei ca. 300–450 nm mit 15 mW/cm², sogenanntes Exposure) seine Löslichkeit im Entwickler (in diesem Fall PGMEA) verändert. SU8-10 zeigt ein Tonwert-negatives Verhalten, d. h. die UV-belichteten Bereiche polymerisieren und unbe-

lichtete Bereiche bleiben im Entwickler lösbar. Die Bestrahlung erfolgte durch Maskenprojektion mittels Lithographic-masken, die entsprechende dünne Chrom-Strukturen auf Quarz aufwiesen. Diese Quarz-Maske besaß die gewünschte laterale Geometrie des Standards, die im Maßstab 1 : 1 in das Polymer abgebildet wurde. Die kleinsten Strukturen in der Maske bestimmten daher auch die kleinsten Strukturen des Standards bzw. des zu detektierenden kleinsten Auflösungstests auf dem Standard.

[0101] Nachfolgend wurde durch einen Temperschritt die Vernetzung der belichteten Bereiche vervollständigt (95°C, 15 min. so genanntes Post-Exposure-Bake). Die unbelichteten Bereiche blieben vom Entwickler noch unberührt. Diese o. g. Prozedur (Spin-On, Pre-Bake, Exposure, so genanntes Post-Exposure-Bake) wurde nun mehrfach wiederholt, wobei die zuvor belichteten (und somit vernetzten) Bereiche in nachfolgenden Belichtungsschritten durch entsprechenden Masken unbelichtet blieben. Im Beispiel wurden aufeinander folgend die Belackung, Belichtung und Temperung drei Mal durchgeführt (Abb. 1). Die drei Schichten hatten dabei bezüglich des Polymers die folgende Zusammensetzung:

1. Schicht: SU8-10 (Fa. MicroChem Inc.) gelöst in PGMEA (Fa. Sigma) 50% w/w
2. Schicht: SU8-10 (Fa. MicroChem Inc.) gelöst in PGMEA (Fa. Sigma) 33% w/w
3. Schicht: SU8-10 (Fa. MicroChem Inc.) gelöst in PGMEA (Fa. Sigma) 20% w/w

[0102] Das Photopolymer SU8-10 wurde in unterschiedlichen Gewichtsverhältnissen in PGMEA gelöst. Dadurch haben die Lösungen unterschiedliche Viskositäten, wodurch Polymerschichten mit unterschiedlicher Dicke herstellbar sind. Das Lösungsmittel wird später weitestgehend ausgetrieben (zu mehr als 95%), so dass die Polymerschichten eine im Wesentlichen gleiche Zusammensetzung aufweisen.

[0103] Danach wurde die Polymerstruktur durch Einlaufen in PGMEA (Fa. Sigma) entwickelt und nochmals getempert (120°C, 30 min. sogenannter Hard-Bake). Infolgedessen entstanden stufenförmige geometrische Strukturen (Abb. 1). Die Stufenhöhen korrespondieren dann mit einer entsprechenden Fluoreszenz-Intensität, die lateralen Geometrien mit dem Auflösungsvermögen.

Beispiel 2

Beispiele für erfindungsgemäße Fluoreszenzzeichstandards

[0104] In Abb. 2A ist ein erfindungsgemäßer Fluoreszenzzeichstandard in Array-Form gezeigt, der auf Borofloatglas (Firma Schott) mikrolithographisch gemäß des Verfahrens aus Beispiel 1 hergestellt wurde. Der Standard besteht aus 9 Array-Elementen, die alle fluoreszierende Polymerschichten in quadratischer Form enthalten. Die Quadrate der 9 Array-Elemente verfügen über 3 Intensitätsstufen, welche aus 3 verschiedenen Dicken resultieren. Durch verschiedene Strukturgrößen und Abstände werden verschiedene Integrationsdichten von molekularen Arrays simuliert. Die Standards wurden im Wafermaßstab erzeugt und in Chips ver einzelt.

[0105] Der Standard eignet sich, um eine Bestimmung des räumlichen Auflösungsvermögens, der geometrischen Fehler, der abbildenden optischen sowie elektromechanischen und informationstechnischen Systeme als auch der Sensitivität des jeweiligen Geräts zum Zeitpunkt der Messung vorzunehmen. Zusätzlich kann der Standard zur geräteübergreifenden Bewertung der Fluoreszenzsignale von Sonden-Array basierten Experimenten verwendet werden. Dazu wurde

der beschriebene Fluoreszenzstandard in verschiedenen Readersystemen ausgelesen, als 16 bit-*.tif Bilder exportiert und mittels einer speziellen Software (IconoClust der Firma Clondiag) analysiert. Die unterschiedlich großen fluoreszierenden Strukturen auf dem Fluoreszenzzeichstandard können verwendet werden, um geometrische Abweichungen der verschiedenen Detektionssysteme zu korrigieren. So lässt sich beispielsweise die Bildfeldwölbung eines optischen Systems zur Fluoreszenzdetektion anhand des dargestellten

Fluoreszenzzeichstandards durch geeignete Bildverarbeitungsprozesse analysieren und durch entsprechende Einstellung der optischen oder informationstechnischen Elemente beheben.

[0106] Es ist fernerhin möglich, die Einstellungen der Detektionssysteme z. B. hinsichtlich der Laser- oder Lampenleistung, der Integrationszeit pro Spot/Subarray oder der Signalverstärkung/Einstellung des Detektors auf einen bestimmten Wert der resultierenden Fluoreszenz des Standards abzustimmen. Damit kann z. B. der Langzeittrend eines Detektionsapparats, welcher durch Alterungsprozesse der verwendeten Laser, Lampen oder Detektoren hervorgerufen werden kann, bestimmt werden.

[0107] Unterschiedliche Fluoreszenzsysteme können also mittels des Fluoreszenzzeichstandards hinsichtlich ihrer leistungsbestimmenden Parameter kalibriert werden. Entsprechend können die Fluoreszenzsignale, die bei der Auswertung eines Sonden-Array basierten Experiments mit verschiedenen Detektionssystemen gemessen werden, direkt miteinander verglichen werden.

[0108] In Abb. 2B ist ein erfindungsgemäßer Fluoreszenzzeichstandard in Array-Form gezeigt, der auf Borofloatglas (Firma Schott) durch Spotten hergestellt wurde. Zunächst wurden fluoreszierende Standards auf verschiedenen Trägern erzeugt, indem Polymergemische SU8 (MCC Inc.) und Novolack (AZ 1514 Clariant) im Massenverhältnis 1 : 2, 1 : 3, 1 : 5 hergestellt und auf die Glassubstrate aufgebracht wurden. Dazu wurden Objektträger gereinigt und mittels eines Nadelspotters (Microgrid 2/Biorobotics) mit den Polymergemischen unter Benutzung einer ungeschlitzten Spotternadel (Solidpins/Biorobotics) bespottet. Alternativ wurden die Polymergemische mit einem piezogetriebenen Dispenserkopf (Durchmesser 100 µm, beheizte Düse der Firma microdrop) aufgebracht. Dabei wurde die Dispenserdüse geheizt (55°C).

[0109] Anschließend wurde folgende Behandlung der Proben vorgenommen.

Pre-Bake: 95°C, 15 min

Exposure: 1 min, 15 mW/cm², Flutbelichtung

Post-Bake: 95°C, 15 min

Hard-Bake: 120°C, 60 min

[0110] Der so hergestellte Standard besteht aus kreisförmigen Bereichen (Spots) einheitlicher Dimensionen, deren Polymerschichten sich sowohl hinsichtlich der Dicke als auch der Zusammensetzung unterscheiden. Daher verfügt der Standard über ein breites Spektrum an Intensitäten und Wellenlängenbereichen der in den Spots hervorrufbaren Fluoreszenz. Der Standard kann in gleicher Weise wie der in Abb. 4A eingesetzt werden.

Beispiel 3

Integration von erfindungsgemäßen Fluoreszenzzeichstandards in Trägersysteme

[0111] In Abb. 3 ist gezeigt, wie ein erfindungsgemäßer Fluoreszenzzeichstandard auf einem Objektträger durch Kle-

ben aufgebracht ist. Als Kleber wurde Polydimethylsiloxan (Sylgard® der Firma Dow) verwendet. Solche Standards können als externes Werkzeug zur Kalibrierung von unterschiedlichen Detektionssystemen verwendet werden.

Beispiel 4

[0112] Einstellung der Intensität und des Bleichverhaltens bei erfindungsgemäßen Fluoreszenzzeichnungsstandards – Verwendung von erfindungsgemäßen Fluoreszenzzeichnungsstandards über mehrere Messungen hinweg.

[0113] Im Beispiel ist gezeigt, dass bei der mikrolithographischen Herstellung von Fluoreszenzzeichnungsstandards mit Polymerschichten in drei unterschiedlichen Dicken (d1, d2, d3) ein Temperprotokoll so gewählt werden kann, dass die Intensität der in den definierten Bereichen nach mehrfacher Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz linear abklingt.

[0114] Abb. 4A zeigt das Bleichverhalten der drei Schichten ohne thermische Behandlung. Es handelt sich um ein nicht-lineares Bleichverhalten. Abb. 4B zeigt das Bleichverhalten der drei Schichten nach thermischer Behandlung. Es handelt sich um ein lineares Bleichverhalten. Zu Linearisierung des zeitlichen Verlaufs der Änderung der resultierenden Fluoreszenzintensitäten wurden die Proben während des Herstellungsprozesses einer thermischen Behandlung von zwei Stunden bei 180°C im Ofen unterzogen und anschließend für ca. 40 Minuten bei einer Wellenlänge zwischen 520 und 600 nm mit 40 mW/cm² bestrahlt. Dabei ändert sich das Intensitätsverhalten dergestalt, dass sich das Dickenverhältnis nicht mehr direkt proportional dem resultierenden Intensitätsverhältnis verhält, allerdings sind die Intensitätsverhältnisse der verschiedenen dicken Strukturen nun bei Bestrahlung konstant (siehe Abb. 4C).

[0115] Man erkennt, dass durch Ändern des Temperprotokolls Fluoreszenzzeichnungsstandards herstellbar sind, die über ein wesentlich weniger ausgeprägtes und wesentlich konstanteres Bleichverhalten verfügen. Die Messungen erfolgten mit einem konfokalen Biochip-Sanner Scanarray 4000 (Packard) bei 100% Laserleistung und 85% PMT-gain.

[0116] Solche langzeitstabilen Fluoreszenzzeichnungsstandards können hervorragend zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich ihrer alterungsbedingten Eigenschaften verwendet werden, da die Intensitäten der drei Schichtdicken sich gleichermaßen verändern und damit das Verhältnis der Intensitäten der verschiedenen dicken Schichten konstant bleibt (siehe Abb. 4C).

Beispiel 5

Referenzierung von Fluoreszenzsignalen

[0117] Es wurden Fluoreszenzzeichnungsstandards wie in Beispiel 1 hergestellt, bei denen in den definierten Bereichen, Polymerschichten mit unterschiedlicher Dicke aufgebracht sind.

[0118] Aus Abb. 5 wird deutlich, dass mit diesen Standards die Referenzierung von Messungen in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen möglich sind (Cy3 und Cy5 absorbieren bei unterschiedlichen Wellenlängen) und die gemessenen Intensitäten sich proportional zur Schichtdicke (d1, d2, d3) verhalten. Dieser Fluoreszenzstandard kann daher wegen seines breitbandigen Fluoreszenzverhaltens in verschiedenen Wellenlängenbereichen zur Kalibrierung von Readersystemen verwendet werden kann. Mit solchen Fluoreszenzzeichnungsstandards, die über eine breitbandige Eigenfluoreszenz verfügen, ist zudem eine Referenzierung von Fluoreszenzsignalen in verschiedenen Wellenlängenbereichen möglich. Darüber hinaus können mit solchen Standards La-

serscanner hinsichtlich ihrer Sensitivität kalibriert werden. Die Messungen erfolgten mit einem konfokalen Biochip-Sanner Scanarray 4000 (Packard) bei 100% Laserleistung und 85% PMT-gain.

5

Beispiel 6

Standardisierung von Sonden-Array basierten Experimenten

[0119] Zur Standardisierung von Sonden-Array basierten Experimenten wurden erfindungsgemäße Fluoreszenzzeichnungsstandards verwendet, die ebenfalls ein Sonden-Array aufwiesen. Der Fluoreszenzzeichnungsstandard kann dann beim Auslesevorgang vor oder nach der Durchführung der biochemischen Wechselwirkungsreaktion jeweils mitberücksichtigt werden (siehe Abb. 6A).

[0120] Es wurden erfindungsgemäße Fluoreszenzzeichnungsstandards auf epoxidierten Objektträgern (Firma QMT) durch Ultraschallbohrung und Einkleben aufgebracht, die in den definierten Bereichen Polymerschichten mit gleicher Polymerdicke aber unterschiedlichem Gehalt bezüglich der Polymerkomponenten aufwiesen. Damit zeigen diese Bereiche nach entsprechender Bestrahlung unterschiedliche Intensitäten. Auf den Träger wurde dann eine Reihe von PCR-Produkten (aceA, acs, amiB, ampG, argC, atpA, creB, icdA, napH, rpoA, rpoH, rpoS) durch Spotting (Firma BioRobotics Microgrid II) aufgebracht. Speziell aufgereinigte und mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3 oder Cy5 der Firma Amersham) markierte spezifische cDNA wurde durch Hybridisierung an den PCR-Spots immobilisiert. Anschließend wurden die Proben mittels eines konfokalen Laserscanners (Affymetrix, Packard) ausgelesen und die Ergebnisse mittels einer speziellen Software (IconoClust der Firma Clondiag) analysiert. Dabei erfolgte die Bewertung der Ergebnisse unter Referenzierung auf die verschiedenen Intensitäten der unterschiedlichen Bereiche des Fluoreszenzzeichnungsstandards.

[0121] Die drei Balken einer cDNA stehen für die Referenzierung der Signaldaten der Hybridisierung auf drei verschiedene Bereiche des Standards, die unterschiedliche Intensitäten aufweisen. Dazu wurden die Ergebnisse auf die verschiedenen Intensitätssstufen normiert und unter Berücksichtigung des Gehalts der Polymerschichten auf eine Stufe gerechnet. Die Graphik (Abb. 6B) zeigt, dass eine solche Rückrechnung zulässig ist, da für jede cDNA gleiche Ergebnisse erhalten werden, unabhängig davon, auf welchen Bereich die Messung der cDNA bezogen wird. Somit ist es bei bekanntem Gehalt der Polymerschichten zulässig, jeden Bereich zur Referenzierung zu verwenden, was die Universalität des Standards erhöht. Die Messungen erfolgten mit einem konfokalen Biochip-Sanner Scanarray 4000 (Packard) bei 100% Laserleistung und 85% PMT-gain.

55

Beschreibung der Abbildungen

[0122] Abb. 1 Herstellung eines erfindungsgemäßen Fluoreszenzzeichnungsstandards durch mehrstufige Photolithographie (Negativprozess).

[0123] Abb. 2A Erfindungsgemäßer Fluoreszenzstandard in Array-Form, mikrolithographisch hergestellt auf Borofloatglas.

[0124] Abb. 2B Erfindungsgemäßer Fluoreszenzstandard in Array-Form, hergestellt durch Spotten auf Borofloatglas.

[0125] Abb. 3 Fluoreszenzzeichnungsstandard auf Objektträger.

[0126] Abb. 4A Veränderungen der resultierenden Lumineszenzintensitäten durch Einwirkung von Strahlung im sichtbaren Bereich (Bleichen oder Bleaching). Die Intensität

ist als Grauwert angegeben.

[0127] Abb. 4B Änderung der Fluoreszenzintensität über die Anzahl der Messungen in einem Weißlicht/CCD System nach Durchführung eines angepassten Temperprotokolls. Die Intensität ist als Grauwert angegeben.

[0128] Abb. 4C Durch angepasste Temperprotokolle ist es möglich, das Bleichverhalten der polymeren Schichten so anzugleichen, dass Veränderungen der Fluoreszenzausbeute über die Anzahl durchgeföhrter Messungen keinen Einfluss auf die resultierenden Intensitätsverhältnisse hat. Die obere 10 Linie gibt das d3/d2-Verhältnis, die untere Linie das d2/d1-Verhältnis aus Abb. 4A an.

[0129] Abb. 5 Messergebnisse eines Scans für verschiedene Farbstoffe. Die Intensität ist als Grauwert angegeben. Diese Standards sind geeignet zur Normierung von Ergebnissen in verschiedenen Wellenlängenbereichen.

[0130] Abb. 6A Inverser Scan eines gespotteten Sonden-Arrays. Im oberen Teil erkennt man den Fluoreszenzstandard (1). Darunter befindet sich der Sonden-Array (2). Es handelt sich um gespottete PCR-Produkte nach Hybridisierung mit Cy3/Cy5 markierter cDNA.

[0131] Abb. 6B Es wurden verschiedene PCR-Produkte gespottet und mit cDNA hybridisiert. Die Ergebnisse wurden auf die verschiedenen Intensitätsstufen von verschiedenen Bereichen normiert (jeweils die drei Balken) und unter Berücksichtigung des Gehalts der Stoffe in den Polymerschichten auf eine Stufe gerechnet. Die Grafik zeigt, dass eine solche Rückrechnung zulässig ist. Es ist also bei bekanntem Gehalt egal, welcher Bereich zur Normierung benutzt wird.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Referenzierung von Fluoreszenz-Signalen, dadurch gekennzeichnet, dass auf einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Träger in definierten Bereichen mindestens eine nach entsprechender Bestrahlung fluoreszierende Polymerschicht aufgebracht ist und dass mindestens zwei der Polymerschichten sich hinsichtlich ihrer Dicke und/oder Zusammensetzung unterscheiden.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerschichten ein oder mehrere Polymere enthalten, wobei mindestens eines der Polymere nach entsprechender Bestrahlung fluoresziert.

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymere Postiv- und/oder Negativ-Photolacke, insbesondere auf Basis von Epoxidharzen wie SU8 und/oder Novolacke und/oder PMMA und/oder photosensitives Polyimid und/oder Benzocyclobuten umfassen.

4. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerschichten neben mindestens einem Polymer zusätzlich fluoreszierende Stoffe enthalten.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die fluoreszierenden Stoffe organische Farbstoffe, insbesondere Azofarbstoffe, Triphenylmethanfarbstoffe, Porphyrinenfarbstoffe und/oder anorganische Farbstoffe, insbesondere metallische Farbstoffe und/oder Lanthanide umfassen.

6. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität der in den Bereichen bei entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch die Wahl der Schichtdicke und/oder der Zusammensetzung der Polymerschichten einstellbar ist.

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekenn-

zeichnet, dass die Intensität der in den Bereichen bei entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz proportional zu der Dicke der in den Bereichen aufgebrachten Polymerschichten einstellbar ist.

8. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität der in den Bereichen bei entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch physikalische Behandlungsmethoden während der Herstellung, bevorzugt durch Bestrahlung und/oder Temperaturbehandlung einstellbar ist.

9. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Anregungswellenlängenbereich der Polymerschichten durch die Wahl der Polymere und/oder der zugegebenen fluoreszierenden Stoffe einstellbar ist.

10. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Bleichverhalten der in den Bereichen nach entsprechender längerer Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch die Wahl der Art und/oder Menge und/oder Zusammensetzung der Polymere und/oder durch die Wahl der Art und/oder Menge und/oder Zusammensetzung der zugegebenen fluoreszierenden Stoffe einstellbar ist.

11. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Bleichverhalten der in den Bereichen nach entsprechender längerer Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch physikalische Behandlungsmethoden während der Herstellung, bevorzugt durch Bestrahlung und/oder Temperaturbehandlung einstellbar ist.

12. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die maximale Dicke der Polymerschichten in mindestens einem der Bereiche deutlich kleiner als die minimale Fokustiefe der zur Fluoreszenz-Messung verwendeten Detektionssysteme ist.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die maximale Dicke der Polymerschichten zwischen wenigen Nanometern und maximal 50 µm liegt, bevorzugt zwischen 100 nm und 10 µm, besonders bevorzugt zwischen 200 nm und 5 µm liegt.

14. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die definierten Bereiche sich in Form und/oder Größe unterscheiden.

15. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die definierten Bereiche die Form von Quadraten und/oder Rechtecken mit Seitenlängen zwischen einigen Nanometern und 5 mm, besonders bevorzugt zwischen 100 nm und 1 mm aufweisen.

16. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die definierten Bereiche die Form von Kreisen mit Durchmessern zwischen einigen Nanometern und 5 mm, besonders bevorzugt zwischen 100 nm und 1 mm aufweisen.

17. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die definierten Bereiche in Array-Form auf dem Träger aufgebracht sind.

18. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger aus im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Materialien besteht, bei denen es sich bevorzugt um Glas, metallisiertes Glas, Silizium, Metall und/oder Kunststoffe handelt.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger aus optisch durchlässigen, im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Materialien besteht, bei denen es sich bevorzugt um Glas, besonders

bevorzugt um Quarzglas und/oder Borosfloat-Glas und/oder Kunststoffe, besonders bevorzugt um PMMA und/oder um Polycarbonat handelt.

20. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Fluoreszenzzeichnungsstandard mit einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Trägersystem verbunden ist, wobei das Trägersystem bevorzugt aus Glas, metallisiertem Glas, Silizium, Metall, und/oder Kunststoffe besteht. 5

10 21. Vorrichtung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Fluoreszenzzeichnungsstandard mit einem optisch durchlässigen, im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Trägersystem verbunden ist, wobei das Trägersystem bevorzugt aus Glas, besonders bevorzugt aus Quarzglas und/oder Borosfloat-Glas und/oder aus Kunststoffen, besonders bevorzugt aus PMMA und/oder aus Polycarbonat besteht. 15

22. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Trägersystem um einen üblichen Objektträger handelt. 20

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Träger oder Trägersystem um einen Sonden-Array handelt, auf dem bevorzugt mindestens eine Substanzbibliothek 25 immobilisiert ist.

24. Vorrichtung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass auf dem Sonden-Array Substanzbibliotheken in Form von Peptiden und/oder Proteinen, bevorzugt in Form von Antikörpern, Rezeptoren, Rezeptor-Ligand-Molekülen, Hormonen oder biologisch aktiven Peptiden immobilisiert sind. 30

25. Vorrichtung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass auf dem Sonden-Array Substanzbibliotheken in Form von Nukleinsäuremolekülen, bevorzugt in Form von DNA-Molekülen und/oder RNA-Molekülen, besonders bevorzugt in Form von genomischer DNA, mRNA, cDNA und/oder rmA immobilisiert sind. 35

26. Vorrichtung nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass auf dem Träger-System oder Objektträger Zellen, Gewebeschnitte, pharmazeutisch wirksame Verbindungen und/oder Plasmide immobilisiert sind. 40

27. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerschichten durch mikrotechnische Verfahren, bevorzugt durch photolithographische Verfahren, durch Trockenätzungen und/oder durch Ionenimplantation, und/oder durch drucktechnische Verfahren, bevorzugt durch Spotten, durch Offsetdruck und/oder durch Walzen, durch Spritzgießen oder durch Oberflächenprägung auf den Träger aufgebracht und/oder strukturiert werden. 45

28. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerschichten durch positive oder negative photolithographische Verfahren auf den Träger aufgebracht und/oder strukturiert werden. 55

29. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerschichten als homogene Schichten durch mikrotechnische Verfahren, bevorzugt durch CVD-, PVD-, besonders bevorzugt durch Spin-On-Verfahren auf den Träger aufgebracht werden. 60

30. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 27 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Dicke der Polymerschichten in Abhängig- 65

keit von den Verfahrensparametern, besonders bevorzugt in Abhängigkeit von der Viskosität des Polymers, von der Temperatur, von der Luftfeuchtigkeit oder von der Umlaufgeschwindigkeit, bei photolithographischen Verfahren besonders bevorzugt in Abhängigkeit von der Bestrahlungs-Dosis, dem Entwicklungsprozess und dem Temperverfahren eingestellt werden kann.

31. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 27 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass die geometrische Form der bei entsprechender Bestrahlung fluoreszierenden Bereiche durch entsprechende Aussparungen in einer Maske, bevorzugt in einer Lochmaske auf Basis von strukturiertem Chrom auf Quarz definiert wird.

32. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 27 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass das Vernetzungsverhalten der Polymerschichten durch Temper- und/oder Bestrahlungsprotokolle einstellbar ist.

33. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 27 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung mit einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden, bevorzugt optisch durchlässigen Trägersystem durch Kleben, durch Lagejustage und/oder durch ein Vakuumsystem verbunden wird.

34. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 26 zur Kalibrierung, bevorzugt zur online Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich ihrer Sensitivität, ihres räumlichen und/oder zeitlichen Auflösungsvermögens und/oder hinsichtlich ihrer geometrischen und/oder dynamischen und/oder alterungsbedingten Eigenschaften.

35. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 34 zur Laserleistungsmessung und/oder -steuerung und/oder zur Lampenleistungsmessung und/oder zum Integrationszeitabgleich und/oder zur Auflösungsanpassung.

36. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 34 zur Flatfieldbestimmung und/oder zur Linearisierung von CCD-Readersystemen.

37. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 26 zur Referenzierung und/oder zum system- und geräteübergreifenden und/oder testübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen, wobei es sich bevorzugt um Fluoreszenzsignale von Sonden-Array basierten Interaktionsstudien handelt.

38. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 37 zum system- und geräteübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen durch Normierung der experimentellen Ergebnisse auf resultierende Intensitäten der Polymerschichten.

39. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 37 zur Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen durch Normierung der experimentellen Ergebnisse auf resultierende Intensitäten der Polymerschichten zur Definition absoluter Ergebnisse oder zur Definition relativer, auf die Fluoreszenz polymerer Schichten bezogener Ergebnisse.

40. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 37 bis 39, wobei es sich bevorzugt um Fluoreszenzsignale von Protein-Protein-Interaktionsstudien, besonders bevorzugt von Antikörper-Antigen- und/oder Rezeptor-Ligand-Interaktionsstudien, und/oder von Nukleinsäure-Nukleinsäure-Interaktionsstudien, besonders bevorzugt von DNA-RNA- und/oder DNA-DNA- und/oder RNA-RNA- Interaktionsstudien und/oder von Protein-Nukleinsäure-Interaktionsstudien handelt.

41. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 26 zum system- und geräteübergreifenden und/oder testübergreifenden Vergleich von zellulären Lokalisationsexperimenten und Gewebschnitten, die durch Fluoreszenz-Mikroskopie auswertbar sind. 5

42. Verwendung einer Vorrichtung, umfassend einen im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Träger, auf dem in einem oder mehreren definierten Bereichen eine hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Dicke einheitliche Polymerschicht so aufgebracht ist, dass dieser Bereich oder diese Bereiche nach entsprechender Bestrahlung fluoreszieren, zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen und/oder Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen und/oder zum system- und geräteübergreifenden und/oder testübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen. 10

43. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 42, wobei die Polymerschichten ein oder mehrere Polymere, von denen mindestens ein Polymer nach entsprechender Bestrahlung fluoresziert, bevorzugt Positiv- und/oder Negativ-Photolacke, insbesondere auf Basis von Epoxidharzen wie SU8 und/oder Novolacke und/oder PMMA und/oder photosensitives Polyimid und/oder Benzocyclobuten umfassen. 20

44. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 oder 43, wobei die Polymerschichten mindestens ein Polymer und zusätzliche fluoreszierende Stoffe, bei denen es sich nicht um Polymere handelt, bevorzugt organische Farbstoffe, insbesondere Azofarbstoffe, Triphenylmethanfarbstoffe, Porphyrinfarbstoffe und/oder anorganische Farbstoffe, insbesondere metallische Farbstoffe und/oder Lanthanide enthalten. 30

45. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 44, wobei die Intensität der in den Bereichen bei entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch die Wahl der Schichtdicke und/oder der Zusammensetzung der Polymerschichten einstellbar ist. 35

46. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 45, wobei die Intensität der in den Bereichen bei entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch physikalische Behandlungsmethoden während der Herstellung, bevorzugt durch Bestrahlung und/oder Temperaturbehandlung einstellbar ist. 45

47. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 46, wobei der Anregungswellenlängenbereich der Polymerschichten durch die Wahl der Polymere und/oder der zugegebenen fluoreszierenden Stoffe einstellbar ist. 50

48. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 47, wobei das Bleichverhalten der in den Bereichen nach entsprechender längerer Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch die Wahl der Art und/oder Menge und/oder Zusammensetzung der Polymere und/oder durch die Wahl der Art und/oder Menge und/oder Zusammensetzung der zugegebenen fluoreszierenden Stoffe einstellbar ist. 55

49. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 48, wobei das Bleichverhalten der in den Bereichen nach entsprechender längerer Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch physikalische Behandlungsmethoden während der Herstellung, bevorzugt durch Bestrahlung und/oder Temperaturbehandlung einstellbar ist. 65

50. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 49, wobei die maximale Dicke der Polymerschicht deutlich kleiner als die minimale Fokustiefe der zur Fluoreszenz-Messung verwendeten Detektionssysteme ist. 6

51. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 50, wobei die maximale Dicke der Polymerschicht zwischen wenigen Nanometern und maximal 50 µm liegt, bevorzugt zwischen 100 nm und 10 µm, besonders bevorzugt zwischen 200 nm und 5 µm liegt. 10

52. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 51, wobei die definierten Bereiche sich in Form und/oder Größe unterscheiden. 15

53. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 52, wobei die definierten Bereiche die Form von Quadraten und/oder Rechtecken mit Seitenlängen zwischen einigen Nanometern und 5 mm, besonders bevorzugt zwischen 100 nm und 1 mm aufweisen. 20

54. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 52, wobei die definierten Bereiche die Form von Kreisen mit Durchmessern zwischen einigen Nanometern und 5 mm, besonders bevorzugt zwischen 100 nm und 1 mm aufweisen. 25

55. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 54, wobei die definierten Bereiche in Array-Form auf den Träger aufgebracht sind. 30

56. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 55, wobei der Träger aus im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Materialien besteht, bei denen es sich bevorzugt um Glas, metallisiertes Glas, Silizium, Metall, und/oder Kunststoffe handelt. 35

57. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 56, wobei der Träger aus optisch durchlässigen, im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Materialien besteht, bei denen es sich bevorzugt um Glas, besonders bevorzugt um Quarzglas und/oder Borofloat-Glas und/oder Kunststoffe, besonders bevorzugt um PMMA und/oder um Polycarbonat handelt. 40

58. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 57, wobei der Fluoreszenzstandard mit einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Trägersystem verbunden ist, wobei das Trägersystem bevorzugt aus Glas, metallisiertem Glas, Silizium, Metall, und/oder Kunststoffe besteht. 45

59. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 58, wobei der Fluoreszenzstandard mit einem optisch durchlässigen, im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Trägersystem verbunden ist, wobei das Trägersystem bevorzugt aus Glas, besonders bevorzugt aus Quarzglas und/oder Borofloat-Glas und/oder aus Kunststoffen, besonders bevorzugt aus PMMA und/oder aus Polycarbonat besteht. 50

60. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 59, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Trägersystem um einen üblichen Objektträger handelt. 55

61. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 60, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Träger oder Trägersystem um einen Sonden-Array handelt, auf dem bevorzugt mindestens eine Substanzbibliothek immobilisiert ist. 60

62. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 61, dadurch gekennzeichnet, dass auf dem Sonden-Array Substanzbibliotheken in Form von Peptiden und/oder Proteinen, bevorzugt in Form von Antikörpern, Rezeptoren, Rezeptor-Ligand-Molekülen, Hormonen oder biologisch aktiven Peptiden immobilisiert sind. 65

63. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 61, dadurch gekennzeichnet, dass auf dem Sonden-Array Substanzbibliotheken in Form von Nukleinsäuremolekülen immobilisiert sind. 6

külen, bevorzugt in Form von DNA-Molekülen und/oder RNA-Molekülen, besonders bevorzugt in Form von genominischer DNA, mRNA, cDNA und/oder rRNA immobilisiert sind.

64. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 59 oder 60, dadurch gekennzeichnet, dass auf dem Träger-System oder Objektträger Zellen, Gewebeschnitte, pharmazeutisch wirksame Verbindungen und/oder Plasmide immobilisiert sind. 5

65. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 64 zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen, wobei die Detektionssysteme hinsichtlich ihres räumlichen Auflösungsvermögens, ihrer Sensitivität, ihrer geometrischen und/oder ihrer alterungsbedingten Eigenschaften kalibriert werden. 10

66. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 64, wobei die Detektionssysteme hinsichtlich der Laserleistung und/oder -steuerung und/oder Lampeleistung und/oder Auflösungsanpassung kalibriert werden. 15

67. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 65 oder 66, wobei die Kalibrierung der Fluoreszenzdetektionssysteme on-line erfolgt. 20

68. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 64, wobei die Referenzierung den system- und geräteübergreifenden und/oder testübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen, bei denen es sich bevorzugt um Fluoreszenzsignale von Sonden-Array basierten Interaktionsstudien handelt, umfasst. 25

69. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 68, 30 wobei der system- und/oder geräteübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen durch Normierung der experimentellen Ergebnisse auf resultierende Intensitäten der Polymerschichten erfolgt.

70. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 68, 35 wobei die Referenzierung die Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen durch Normierung der experimentellen Ergebnisse auf resultierende Intensitäten der Polymerschichten zur Definition absoluter Ergebnisse oder zur Definition relativer, auf die Fluoreszenz polymerer Schichten bezogener Ergebnisse umfasst. 40

71. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 68 bis 70, wobei es sich bevorzugt um Fluoreszenzsignale von Protein-Protein-Interaktionsstudien, besonders bevorzugt von Antikörper-Antigen- und/oder Rezeptor-Ligand-Interaktionsstudien, und/oder von Nukleinsäure-Nukleinsäure-Interaktionsstudien, besonders bevorzugt von DNA-RNA- und/oder DNA-DNA- und/oder RNA-RNA- Interaktionsstudien und/oder von Protein-Nukleinsäure-Interaktionsstudien handelt. 45

72. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 64, wobei es sich um einen system- und geräteübergreifenden und/oder testübergreifenden Vergleich von zellulären Lokalisationsexperimenten 50 und Gewebeschnitten, die durch Fluoreszenz-Mikroskopie auswertbar sind, handelt. 55

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

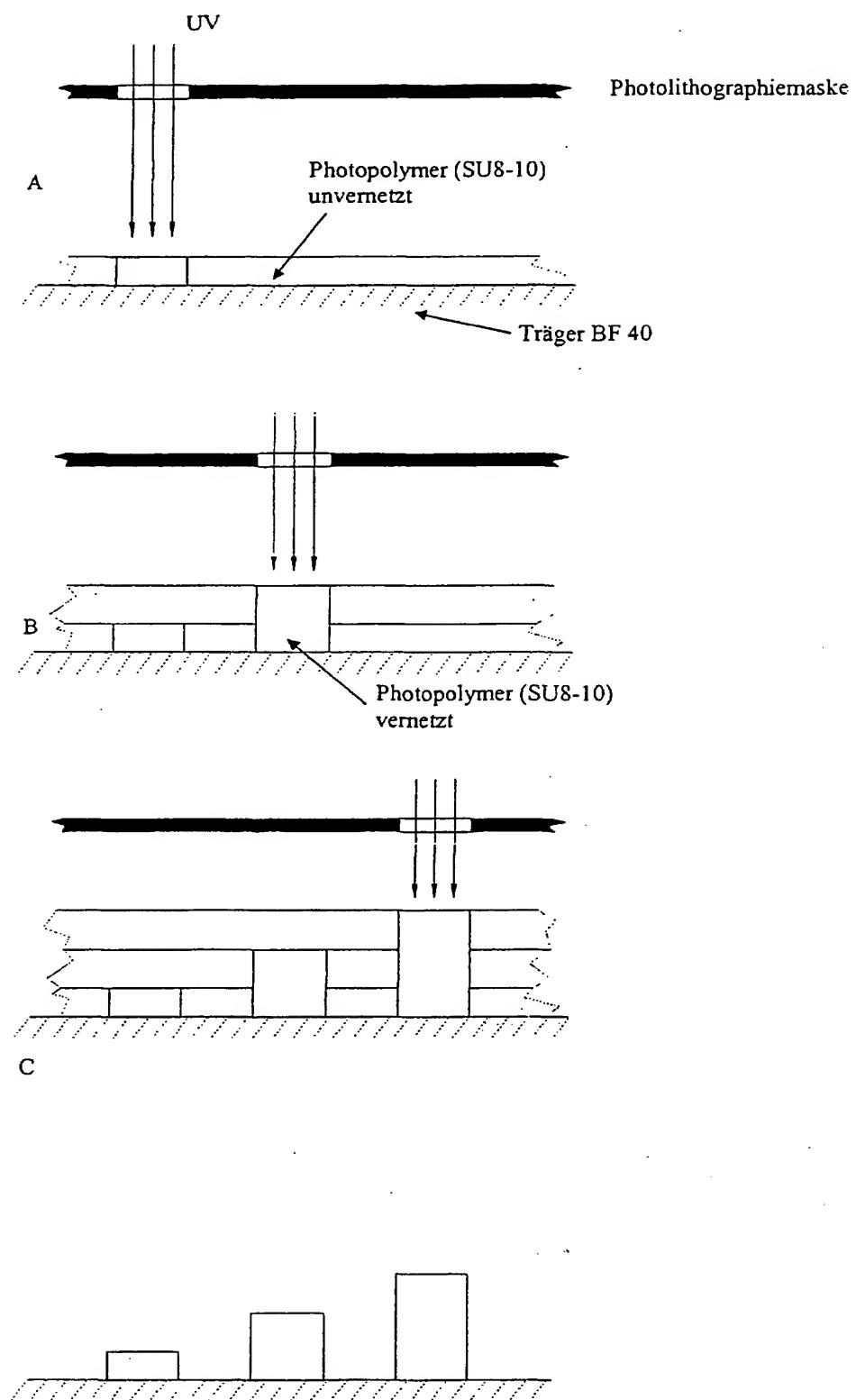


Abb. 1

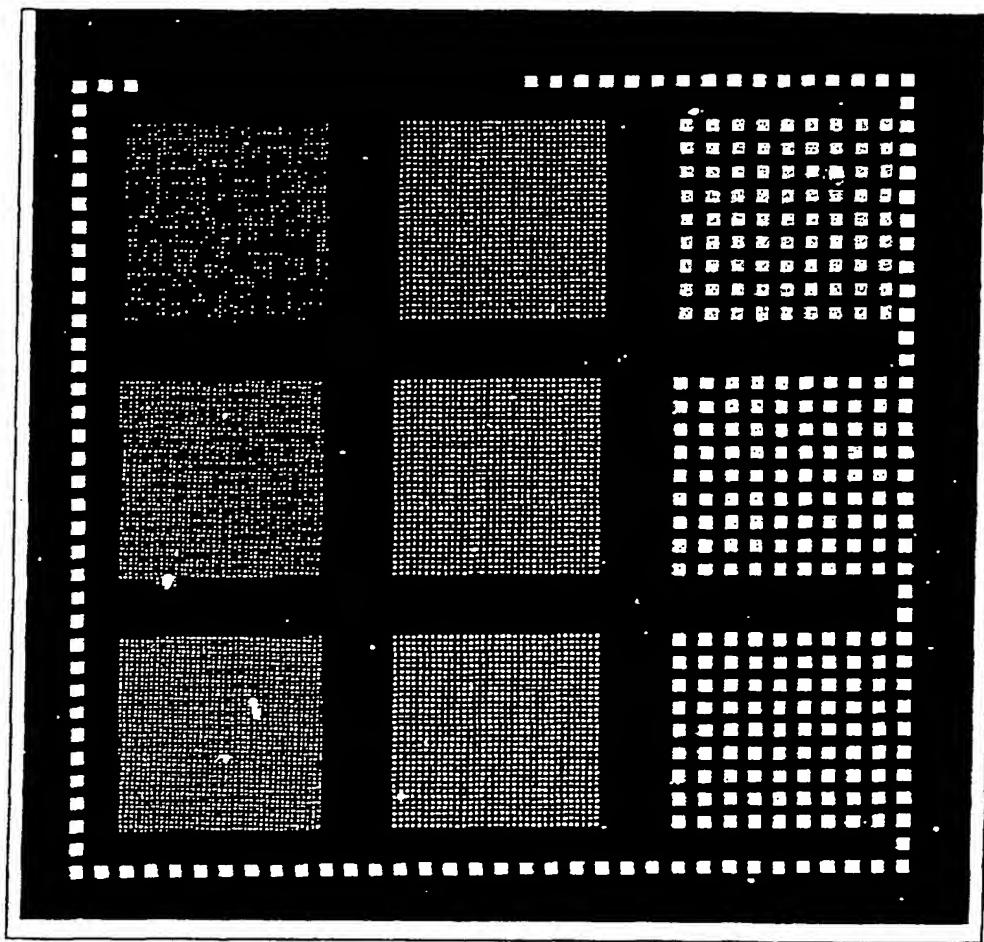


Abb. 2A

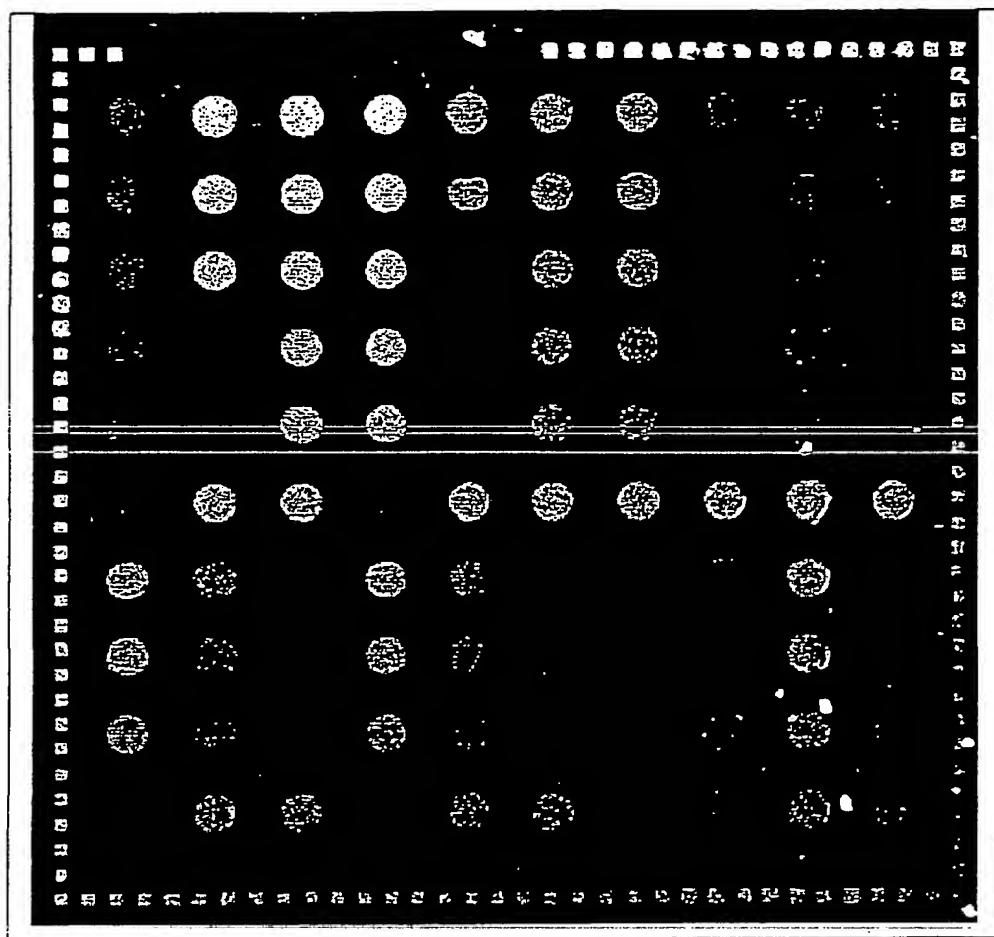


Abb. 2B

Nummer:
Inventar:
Ortsangabe:
Abgabungstag:

DE 102 00 865 A1
G 01 N 33/543
10. Oktober 2002

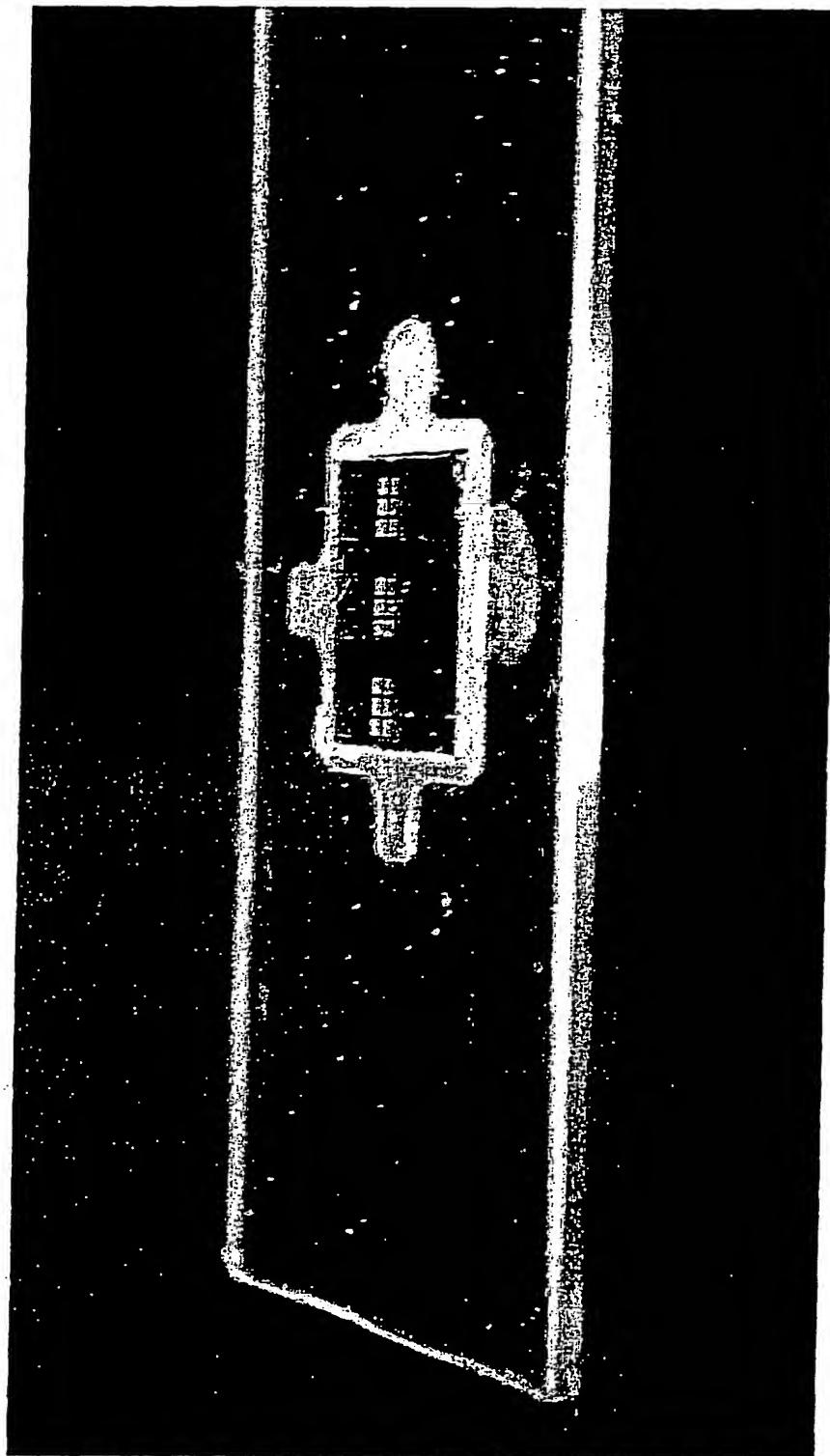


Abb. 3

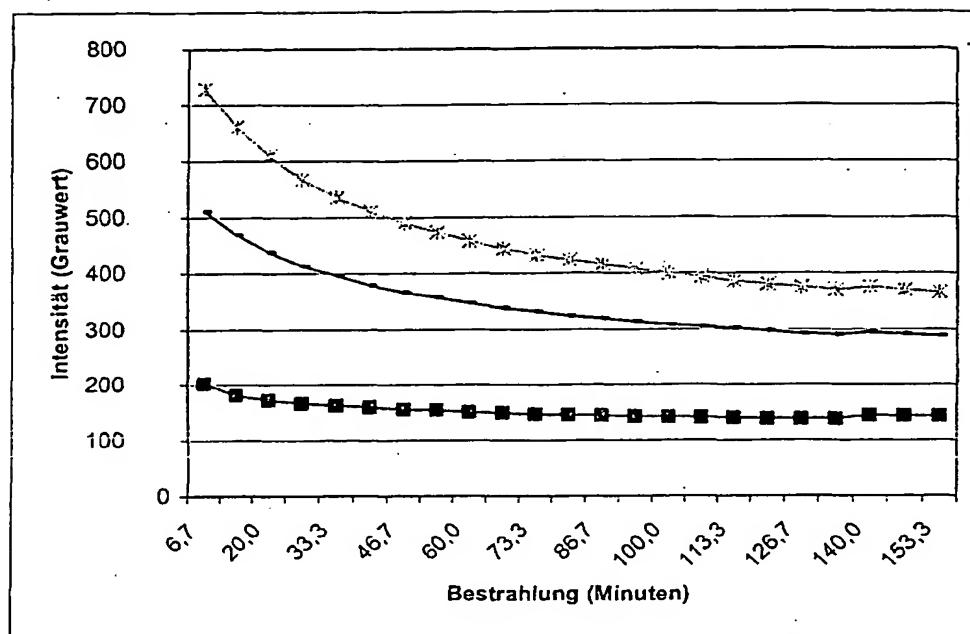


Abb. 4A

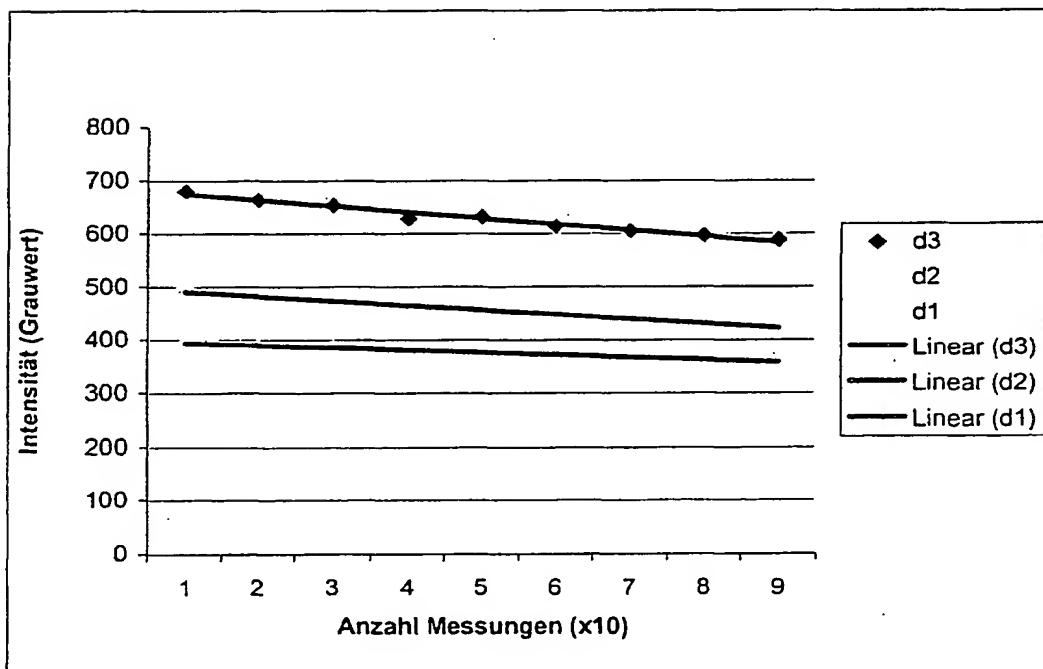


Abb. 4B

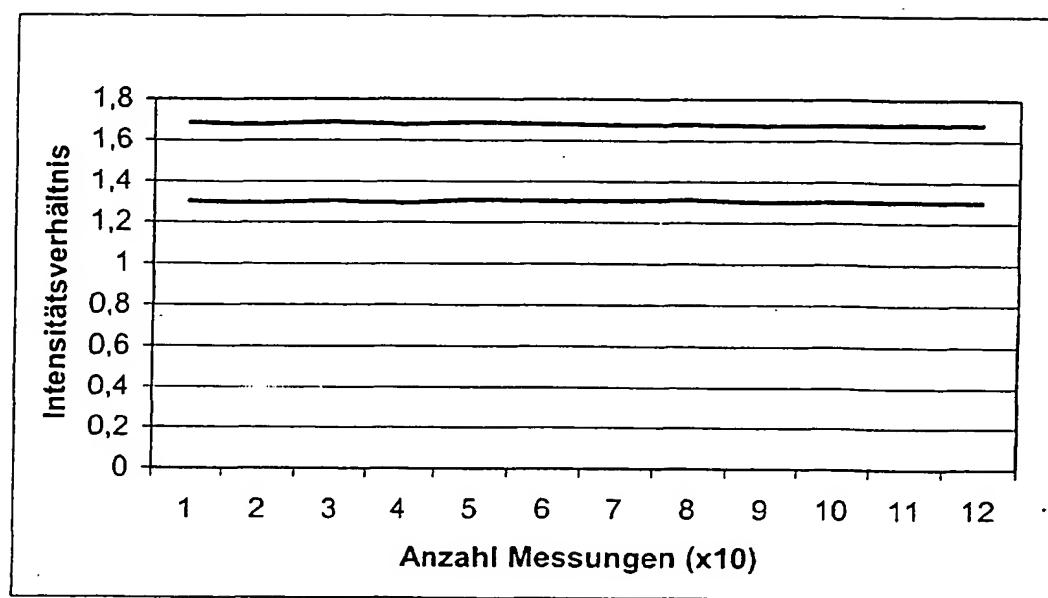


Abb. 4C

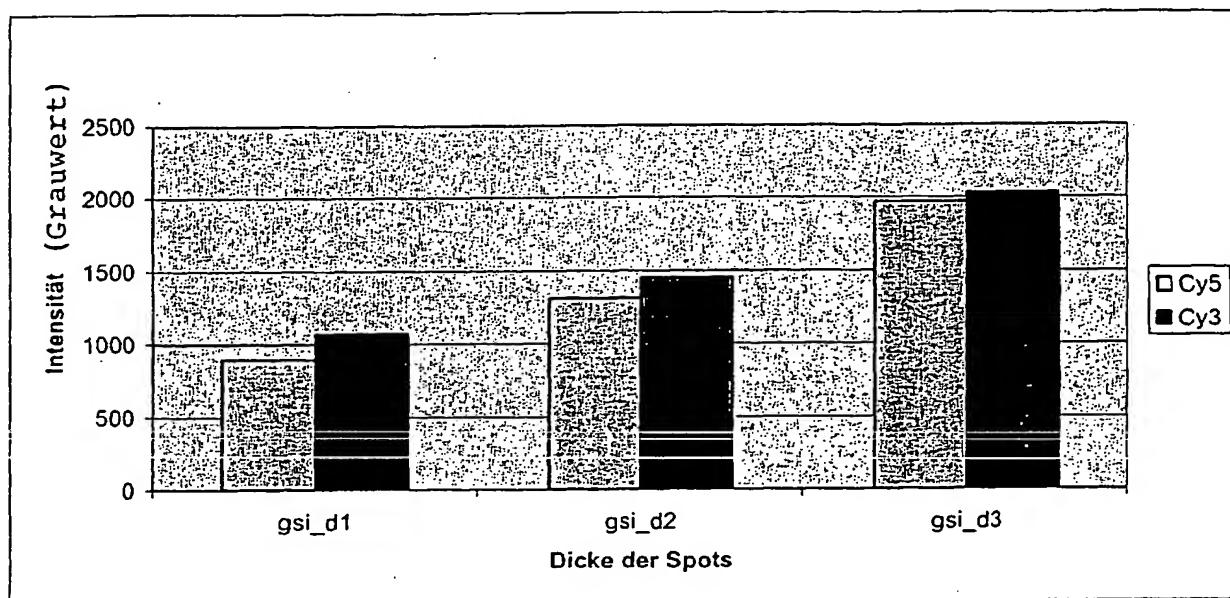


Abb. 5

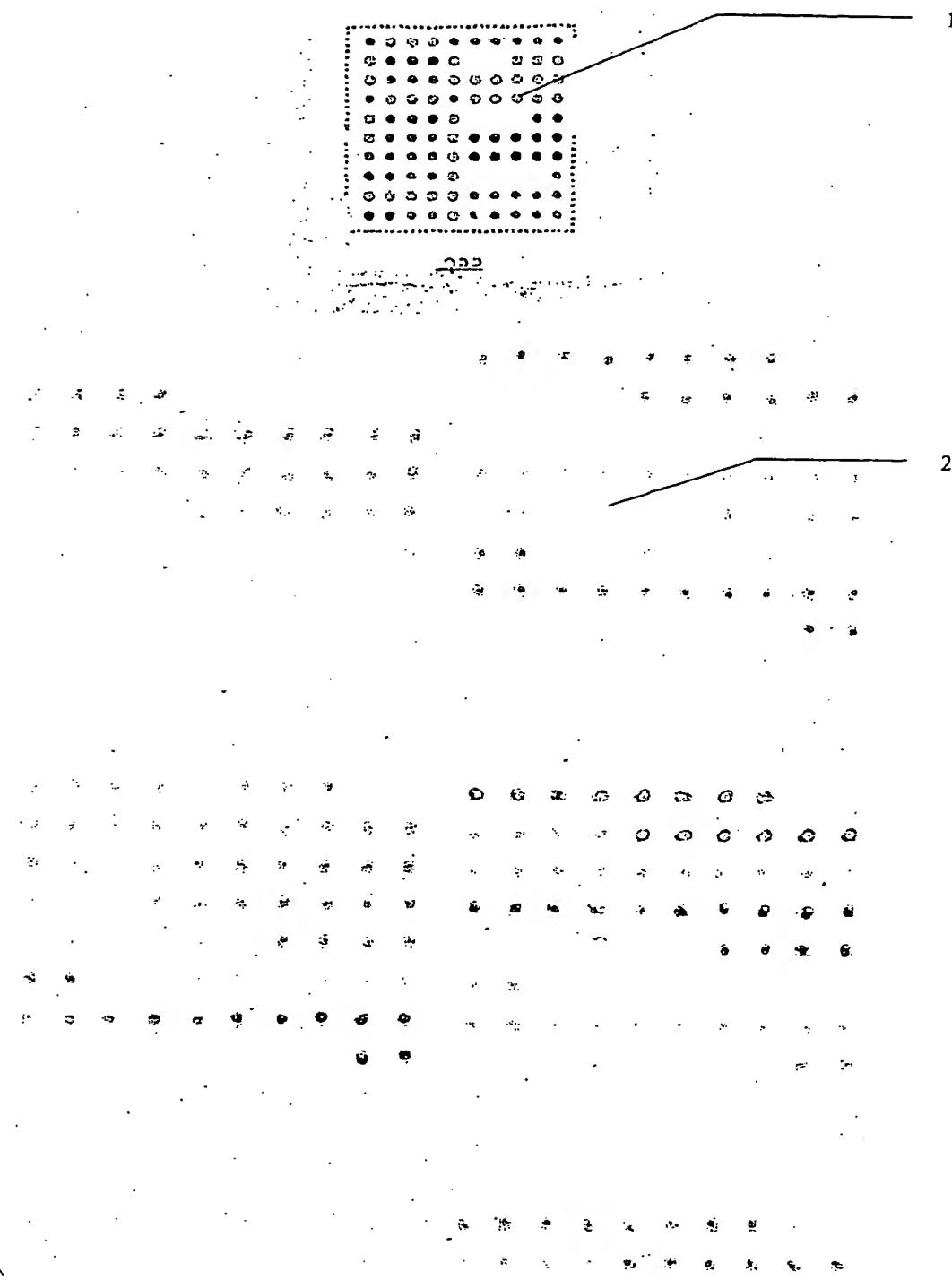


Abb. 6A

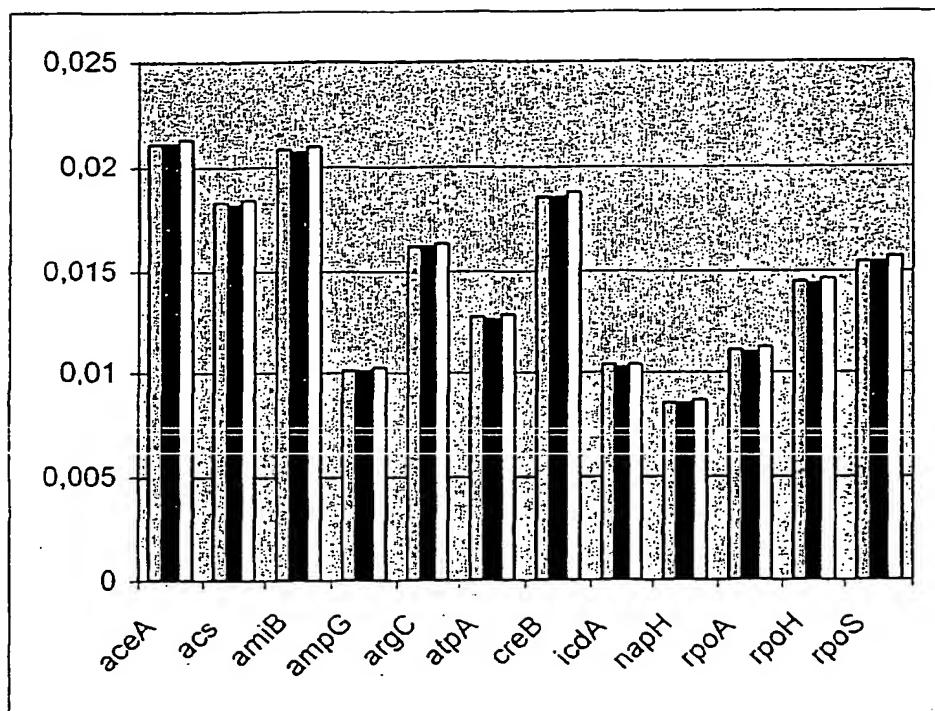


Abb. 6B

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.